

**Pharmakologische  
Untersuchungen  
in vitro –  
Alternativen  
zum Tierversuch**

hrsg von  
E. Weber









Forschungszentrum Jülich GmbH  
Projektträgerschaft Biologie, Energie und Ökologie

## Pharmakologische Untersuchungen in vitro – Alternativen zum Tierversuch

E. Weber (Hrsg)

Gefördert durch den Bundesminister für Forschung  
und Technologie (BMFT) Bonn  
Forschungsvorhaben BEO 038520, Abschlußbericht

erstellt vom Zuwendungsempfänger A. Nattermann & Cie GmbH, Köln  
Projektleiter: Dr. Dr. Reinhard Niemann  
Mitarbeiter: M.J. Parnham, PHD; Ch. Bittner; Dr. H.O. Borbe; Dr. H.J. Diehl;  
Dr. W. Englberger; E. Hoff; Dr. U. Hoppe; Dr. A.M. Hüther; Dr. P. Kuhl;  
Dr. S. Leyck; Dr. A. Sauer

Herausgeber    Forschungszentrum Jülich GmbH  
und Vertrieb:    ZENTRALBIBLIOTHEK  
                    Postfach 1913 · D-5170 Jülich  
                    Telefon (02461) 61-5368 · Telefax (02461) 61-6103

Druck:            Weka-Druck, Linnich

Copyright:      Forschungszentrum Jülich 1990

Monographien des Forschungszentrums Jülich

ISSN 0938-6505

ISBN 3-89336-042-5

## E i n f ü h r u n g

Der Bundesminister für Forschung und Technologie in Bonn fördert im Rahmen seines Programms "Angewandte Biologie und Biotechnologie" die Entwicklung von Alternativmethoden zum Tierversuch. Im Dezember 1984 hat der BMFT hierzu eine Bekanntmachung veröffentlicht. Danach konnten Untersuchungen gefördert werden mit dem Ziel, Mikroorganismen, Zellkulturen, subzelluläre Bestandteile, biochemische Methoden und computergestützte Verfahren auf ihre Eignung als in vitro-Modell zu prüfen. In einer Vielzahl von Projekten haben sich Industrie und Hochschule an der Umsetzung dieses Förderprogramms beteiligt.

Der hier vorgestellte Abschlußbericht der Firma Nattermann ist ein Beispiel für das intensive wissenschaftliche Bemühen, in vitro-Methoden alternativ zu Tierversuchen für die Forschung zu erschließen. Folgendes ist dabei deutlich geworden:

- Eine Alternativmethode sollte die Untersuchung von Wirkungsmechanismen möglich machen.
- In vitro-Prüfmodelle sind aussagefähiger, wenn sie nach Art einer Test-Batterie konstruiert sind. Die in mehreren Schritten gewonnenen Ergebnisse ergeben ein Gesamtbild, das den in vivo-Verhältnissen näher kommt als die Messungen eines einzelnen in vitro-Ansatzes.
- Alternativmethoden lassen sich in bestimmten Fällen entwickeln. Sie können vor allem beim Screening auf pharmakologische Substanzen und in der bio-medizinischen Forschung eingesetzt werden.

### *Summary*

The aim of the project "Pharmacological investigations in vitro - alternatives to animal experiments", was to develop, on "pain-free" cells and tissues, tests which could be utilized for the screening of potential drugs. These tests, as for whole animal experiments, were intended to permit the decision of test compounds into "active"/"interesting" or "inactive"/"uninteresting" compounds. The in-vitro models upon which the research effort was concentrated were intended to reveal:

- anti-inflammatory and immunoregulatory compounds
- antiatherosclerotic compounds
- compounds active as cardiovascular and psychotropic agents
- antiparasitic compounds.

For each of these indications a variety of in-vitro tests were investigated. While mainly receptor binding assays were developed for cardiovascular and CNS indications, the tests developed for inflammation/rheumatic disorders facilitate the detection of compounds which:

- influence cellular and humoral immune responses,
- inhibit release or action of lymphokines,
- inhibit receptor-mediated actions of PAF,
- inhibit production of reactive oxygen species by activated macrophages,
- stimulate phagocytic activity of macrophages,
- inhibit formation or action of individual leukotrienes.

For the field of "Atherosclerosis" in-vitro screening tests were developed which facilitate the detection of compounds which

- raise hepatic LDL-receptor activity,
- modulate HDL-receptor activity in cells peripheral to the liver,
- stimulate the secretion of cholesterol-rich HDL-particles by cholesterol-loaded cells,
- prevent the oxidative modification and thereby the ageing of lipoproteins,
- inhibit cholesterol biosynthesis and storage,
- reduce the activity of the cholesterol-esterifying enzyme.

The selection of in-vitro tests was completed by methods for the detection and differentiation of cytostatic or cytotoxic compounds. It proved possible to demonstrate a good correlation between results of in vitro and in vivo investigations for some of the cell culture models utilized.

The mechanistical predictive potential, the small amount of test compound required, the large screening capacity and the rapid and inexpensive nature of these tests are clear advantages over animal experiments. During the period covered by this project, the animal requirements within Nattermann were drastically reduced, as exemplified by rat requirements which between 1983 and 1988 were reduced by 75 %.

## ZUSAMMENFASSUNG

Das Projekt "Pharmakologische Untersuchungen in vitro - Alternativen zum Tierversuch" wurde im September 1983 gestartet und hatte das Ziel, Tests an "schmerzfreier Materie" zu entwickeln, die für die erste Prüfung potentieller Pharmaka, das sogenannte Screening, eingesetzt werden können und ebenso gut wie Ganztier-Experimente die Einteilung in die Kategorien "wirksam" oder "unwirksam" bzw. "verfolgenswert" oder "nicht verfolgenswert" erlauben. Im Rahmen dieses Projektes wurden In-vitro-Modelle entwickelt zur Auffindung

- antiphlogistisch und immunregulatorisch wirksamer Substanzen
- antiatherosklerotisch wirksamer Substanzen
- kardiovaskulär und psychotrop wirksamer Substanzen
- antiparasitär wirksamer Substanzen.

Im Rahmen der Untersuchungen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- 1) Es wurden etwa 40 In-vitro-Modelle entwickelt. Als Beispiele seien genannt: Lymphozytenstimulation, Makrophagen-Chemilumineszenz, Glutathionperoxidase-ähnliche Aktivität, Bildung von ApoE- und Cholesterin-reichen HDL-Partikeln durch Cholesterin-beladene Makrophagen, LDL-Rezeptor-Genexpression in HepG2-Zellen, Hemmung der Endothelzell-vermittelten Alterierung von LDL, Rezeptorassay für atriale natriuretische Peptide und Plasmodium-berghei-Phagozytose-Test.
- 2) Für alle Prüfmodelle wurden detaillierte Arbeitsvorschriften erarbeitet.
- 3) Die Aussagekraft der Testsysteme wurde durch Prüfung relevanter Referenzsubstanzen und ihre Praxistauglichkeit durch ihren Einsatz im generellen "Screening" belegt. Wenn möglich wurden die in vitro erzielten Ergebnisse mit denen relevanter tierexperimenteller Untersuchungen verglichen.

- 4) Der Einsatz von In-vitro-Modellen beim Screening anstelle von In-vivo-Modellen setzt die Erkenntnis voraus, daß hier in der Regel Substanzen gefunden werden, deren Wirkung zumeist definierten Mechanismen folgt, die durch das Design des jeweiligen Modells bestimmt werden. Die Entwicklung von Pharmaka mit definiertem Angriffspunkt entspricht nicht nur dem Trend heutiger Arzneimittelforschung, sondern bedeutet auch einen Schritt vorwärts in Richtung auf eine möglichst kausale Therapie.

Substanzen, die erst nach Metabolisierung in ihre eigentliche Wirkstruktur überführt werden (sogenannte "Pro-Drugs") werden in vitro im allgemeinen nicht erkannt und somit als nicht wirksam aussortiert. Nach unseren Erfahrungen ist das aber eine vernachlässigbar kleine Anzahl.

Ebenfalls werden beim In-vitro-Screening solche Verbindungen als nicht wirksam erkannt, die den gewünschten therapeutischen Effekt über einen anderen Mechanismus ausüben. Wenn also keine klaren Vorstellungen über die relevanten pathophysiologischen Mechanismen existieren, die es pharmakologisch zu beeinflussen gilt, so können mehrere unterschiedliche In-vitro-Untersuchungen für das erste Screening durchgeführt und so der Gefahr begegnet werden, potentielle Wirkstrukturen zu verlieren. Das trifft z.B. für das Indikationsgebiet "chronische Entzündung/Rheuma" zu.

- 5) Fehlende In-vitro-/In-vivo-Korrelation ist zumeist darauf zurückzuführen, daß die jeweilige Substanz nicht oder schlecht resorbiert wird und/oder metabolisch so instabil ist, daß im Plasma oder am Zielorgan genügend hohe Konzentrationen nicht erreicht werden können.

- 6) Für den Indikationsbereich "akute und chronische Entzündung" wurde angesichts des komplexen pathophysiologischen Geschehens eine ganze Palette von sich gegenseitig ergänzenden In-vitro-Modellen entwickelt, deren Basis neueste wissenschaftliche Erkenntnisse über entzündliche Mechanismen und immunologische Prozesse darstellten und die zumeist mit sogenannten "Entzündungszellen" (Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen) durchgeführt werden können. Eine besondere Bedeutung wurde dabei den "Entzündungsmediatoren" gewidmet.
- 7) Zur Auffindung kardiovaskulär und psychotrop wirksamer Substanzen wurden fast ausschließlich Rezeptorbindungsmodelle entwickelt. Die Palette reicht dabei von Bindungsuntersuchungen an  $\alpha$ -,  $\beta$ -, Acetylcholin-, Benzodiazepin-Rezeptoren u.a., die mittlerweile schon zum Standardrepertoire pharmakologischer Institute und pharmazeutischer Unternehmen gehören, bis hin zu einem Rezeptorassay für "atriale natriuretische Peptide", die selbst oder deren Beeinflussung seit einigen Jahren zunehmendes Interesse bei Pharmakologen und Klinikern gefunden hat.
- 8) Die für das Indikationsgebiet "Atherosklerose und Lipide" entwickelten Testverfahren folgen im wesentlichen drei therapeutischen Prinzipien: Senkung des Plasma-Cholesterins, Stimulierung des Rücktransportes von Cholesterin aus der Gefäßwand und Hemmung oxidativ bedingter Veränderungen der Plasma-Lipide, von denen letztere zunehmend als eine Hauptursache für die Entstehung der Atherosklerose angesehen werden. Die den Testmodellen zugrunde liegenden Ideen sind entweder neu oder stellen eine Weiterentwicklung von Konzepten dar und die Methoden entsprechen modernstem technologischen Standard (z.B. Messung der Genexpression).
- 9) Einige zelluläre parasitologische Prüfmodelle erlauben nicht nur die Auffindung potentiell antiparasitär wirksamer Substanzen, sondern auch von Verbindungen, die einen stimulierenden oder hemmenden Einfluß auf die Immunabwehr haben.

- 10) Die ausführlichen Arbeitsvorschriften für die einzelnen Modelle und die detaillierte Diskussion stellt die Möglichkeit des Transfers dieser Modelle in andere Pharmaunternehmen sicher, so daß die dort tätigen Wissenschaftler auch die Chance haben, die beschriebenen Testverfahren weiterzuentwickeln, zu optimieren oder zu modifizieren, um sie auf die jeweilige Problemstellung zu adaptieren.
- 11) Als Vorteile des In-vitro-Screenings gegenüber dem Tierversuch erwiesen sich die Vorgabe des Mechanismus, der geringere Substanzbedarf, der größere Probendurchsatz und die zumeist schnellere und kostengünstigere Prüfung.
- 12) Während der Laufzeit des Projektes kam es bei Nattermann zu einer drastischen Reduktion des Tierbedarfs, der z.B. bei der Ratte von 1983 bis 1988 um drei Viertel gesenkt werden konnte.



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Entwicklung eines Arzneimittels	1
1.2 Möglichkeit der Reduzierung von Tierversuchen	2
1.3 Vergleich In-vivo-/In-vitro-Prüfung beim Screening	3
1.4 Unser Projekt "Pharmakologische Untersuchungen in vitro - Alternativen zum Tierversuch"	6
 <b>2. IN-VITRO-TESTMODELLE ZUR ENTWICKLUNG ANTIPHLOGISTISCHER UND IMMUNREGULATORISCHER SUBSTANZEN</b>	 <b>11</b>
<b>2.1 Einführung</b>	<b>11</b>
2.1.1 Akute Entzündung	11
2.1.2 Chronische Entzündung	16
<b>2.2 Lymphozytenstimulation</b>	<b>20</b>
2.2.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	20
2.2.2 Material und Methoden	20
2.2.3 Ergebnisse und Diskussion	22
<b>2.3 Immunglobulinsynthese</b>	<b>29</b>
2.3.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	29
2.3.2 Material und Methoden	29
2.3.3 Ergebnisse und Diskussion	31
<b>2.4 In-vitro-Immunisierung von Milz-Lymphozyten mit Schaf- Erythrozyten</b>	<b>34</b>
2.4.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	34
2.4.2 Material und Methoden	34
2.4.3 Ergebnisse und Diskussion	37
<b>2.5 Interleukin-2-Freisetzung</b>	<b>39</b>
2.5.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	39
2.5.2 Material und Methoden	39
2.5.3 Ergebnisse und Diskussion	40
<b>2.6 Chemilumineszenz von Makrophagen</b>	<b>44</b>
2.6.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	44
2.6.2 Material und Methoden	44
2.6.3 Ergebnisse und Diskussion	48

<b>2.7 <math>H_2O_2</math>-Freisetzung durch aktivierte Makrophagen</b>	<b>67</b>
2.7.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	67
2.7.2 Material und Methoden	67
2.7.3 Ergebnisse und Diskussion	70
<b>2.8 <math>\beta</math>-Glucuronidase-Freisetzung aus Makrophagen</b>	<b>72</b>
2.8.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	72
2.8.2 Material und Methoden	72
2.8.3 Ergebnisse und Diskussion	75
<b>2.9 <math>PGE_2</math>- und <math>LTC_4</math>-Freisetzung aus Makrophagen</b>	<b>77</b>
2.9.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	77
2.9.2 Material und Methoden	77
2.9.3 Ergebnisse und Diskussion	83
<b>2.10 Neutrophilen-Aggregation</b>	<b>89</b>
2.10.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	89
2.10.2 Material und Methoden	89
2.10.3 Ergebnisse und Diskussion	92
<b>2.11 Inhibition der Arachidonsäure-Freisetzung</b>	<b>99</b>
2.11.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	99
2.11.2 Material und Methoden	100
2.11.3 Ergebnisse und Diskussion	103
<b>2.12 Inhibition des 5-Lipoxygenase-Weges in Granulozyten</b>	<b>105</b>
2.12.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	105
2.12.2 Material und Methoden	105
2.12.3 Ergebnisse und Diskussion	109
<b>2.13 Inhibition des Cyclooxygenase-Weges</b>	<b>115</b>
2.13.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	115
2.13.2 Material und Methoden	116
2.13.3 Ergebnisse und Diskussion	119
<b>2.14 Inhibition des 5-Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-Weges in RBL-1-Zellen</b>	<b>123</b>
2.14.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	123
2.14.2 Material und Methoden	123
2.14.3 Ergebnisse und Diskussion	126
<b>2.15 Inhibition des 12-Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-Weges in Mauskeratinozyten</b>	<b>131</b>
2.15.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	131
2.15.2 Material und Methoden	131
2.15.3 Ergebnisse und Diskussion	134

<b>2.16 Prüfung auf Glutathion-Peroxidase-ähnliche Aktivität</b>	<b>137</b>
2.16.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	137
2.16.2 Material und Methoden	137
2.16.3 Ergebnisse und Diskussion	140
<b>2.17 Inhibition von Kollagenasen</b>	<b>143</b>
2.17.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	143
2.17.2 Material und Methoden	143
2.17.3 Ergebnisse und Diskussion	159
<b>2.18 Inhibition der Elastase aus polymorphkernigen (PMN-) Leukozyten</b>	<b>177</b>
2.18.1 Prinzip des Testverfahrens	177
2.18.2 Material und Methoden	177
2.18.3 Ergebnisse und Diskussion	186
<b>2.19 Hyaluronsäurebiosynthese in vitro</b>	<b>190</b>
2.19.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	190
2.19.2 Material und Methoden	190
2.19.3 Ergebnisse und Diskussion	191
<b>2.20 Inhibition der C3-Konvertase</b>	<b>194</b>
2.20.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	194
2.20.2 Material und Methoden	194
2.20.3 Ergebnisse und Diskussion	199
<b>2.21 KB-Zellen-Test</b>	<b>205</b>
2.21.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	205
2.21.2 Material und Methoden	206
2.21.3 Ergebnisse und Diskussion	211
<b>3. REZEPTORUNTERSUCHUNGEN ZUR AUFFINDUNG KARDIOVASKULÄR UND PSYCHOTROP WIRKSAMER SUBSTANZEN</b>	<b>221</b>
<b>3.1 Einführung</b>	<b>221</b>
<b>3.2 Bindungsuntersuchungen an <math>\alpha</math>-Adrenoceptoren</b>	<b>224</b>
3.2.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	224
3.2.2 Material und Methoden	224
3.2.3 Ergebnisse und Diskussion	230
<b>3.3 Bindungsuntersuchungen an <math>\beta</math>-Adrenoceptoren</b>	<b>235</b>
3.3.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	235
3.3.2 Material und Methoden	235
3.3.3 Ergebnisse und Diskussion	238

<b>3.4 Bindungsuntersuchungen an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren</b>	<b>240</b>
3.4.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	240
3.4.2 Material und Methoden	240
3.4.3 Ergebnisse und Diskussion	243
<b>3.5 Verdrängung von <math>^3\text{H}</math>-Imipramin von der Imipraminbindungsstelle</b>	<b>247</b>
3.5.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	247
3.5.2 Material und Methoden	247
3.5.3 Ergebnisse und Diskussion	250
<b>3.6 Bindungsuntersuchungen an Benzodiazepin-Rezeptoren</b>	<b>254</b>
3.6.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	254
3.6.2 Material und Methoden	254
3.6.3 Ergebnisse und Diskussion	257
<b>3.7 Rezeptorassay für Atriale Natriuretische Peptide (ANP)</b>	<b>260</b>
3.7.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	260
3.7.2 Material und Methoden	260
3.7.3 Ergebnisse und Diskussion	268
<b>3.8 Hemmung der Phosphodiesterase</b>	<b>278</b>
3.8.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	278
3.8.2 Material und Methoden	278
3.8.3 Ergebnisse und Diskussion	284
<b>4. IN-VITRO-TESTVERFAHREN ZUR AUFFINDUNG VON ANTIATHEROSKLEROTISCH WIRKENDEN SUBSTANZEN</b>	<b>290</b>
<b>4.1 Einführung</b>	<b>290</b>
<b>4.2 Einbau von <math>^{14}\text{C}</math>-Acetat in Cholesterin und Fettsäuren von kultivierten Hautfibroblasten</b>	<b>298</b>
4.2.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	298
4.2.2 Material und Methoden	298
4.2.3 Ergebnisse und Diskussion	306
<b>4.3 Hemmung der HMG-CoA-Reduktase</b>	<b>312</b>
4.3.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	312
4.3.2 Material und Methoden	312
4.3.3 Ergebnisse und Diskussion	315

<b>4.4 Cholesterin-Einschleusung und Cholesterin-Veresterung in Makrophagen</b>	<b>322</b>
4.4.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	322
4.4.2 Material und Methoden	323
4.4.3 Ergebnisse und Diskussion	331
<b>4.5 Bildung von ApoE- und Cholesterin-reichen HDL-Partikeln durch Cholesterin-beladene Makrophagen</b>	<b>353</b>
4.5.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	353
4.5.2 Material und Methoden	353
4.5.3 Ergebnisse und Diskussion	365
<b>4.6 Inhibition der Acyl-CoA: Cholesterin-Acyltransferase</b>	<b>379</b>
4.6.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	379
4.6.2 Material und Methoden	379
4.6.3 Ergebnisse und Diskussion	383
<b>4.7 Bestimmung der HDL-Rezeptordichte an Makrophagen</b>	<b>408</b>
4.7.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	408
4.7.2 Material und Methoden	408
4.7.3 Ergebnisse und Diskussion	416
<b>4.8 Bestimmung der LDL-Rezeptordichte an HepG2-Zellen</b>	<b>425</b>
4.8.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	425
4.8.2 Material und Methoden	425
4.8.3 Ergebnisse und Diskussion	432
<b>4.9 Bestimmung der LDL-Rezeptor-Genexpression in HepG2-Zellen</b>	<b>448</b>
4.9.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	448
4.9.2 Material und Methoden	448
4.9.3 Ergebnisse und Diskussion	461
<b>4.10 Hemmung der Endothelzell-vermittelten Alterierung von LDL</b>	<b>473</b>
4.10.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	473
4.10.2 Material und Methoden	473
4.10.3 Ergebnisse und Diskussion	484
<b>4.11 Hemmung der oxidativen Modifizierung von Membranphospholipiden</b>	<b>498</b>
4.11.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	498
4.11.2 Material und Methoden	498

<b>5. ZELLULÄRE PARASITOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR AUFFINDUNG VON WIRKSUBSTANZEN</b>	<b>506</b>
<b>5.1 DNA-Synthese in <i>Trichomonas vaginalis</i>/ Wachstumskurve von <i>T. vaginalis</i></b>	<b>506</b>
5.1.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	506
5.1.2 Material und Methoden	506
5.1.3 Ergebnisse und Diskussion	509
<b>5.2 Zytotoxizitätstest - <i>Trichomonas vaginalis</i></b>	<b>514</b>
5.2.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	514
5.2.2 Material und Methoden	514
5.2.3 Ergebnisse und Diskussion	516
<b>5.3 Protein- und DNA-/RNA-Synthese in <i>Plasmodium berghei</i></b>	<b>518</b>
5.3.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	518
5.3.2 Material und Methoden	518
5.3.3 Ergebnisse und Diskussion	520
<b>5.4 <i>Plasmodium-berghei</i>-Phagozytose-Test</b>	<b>526</b>
5.4.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	526
5.4.2 Material und Methoden	526
5.4.3 Ergebnisse und Diskussion	529
<b>5.5 Wachstumskurve von <i>Trypanosoma brucei brucei</i></b>	<b>540</b>
5.5.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit	540
5.5.2 Material und Methoden	540
5.5.3 Ergebnisse	541
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>547</b>

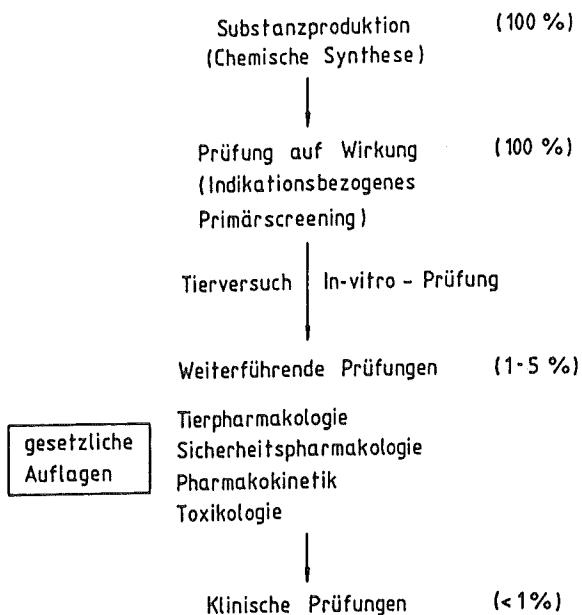
## 1. EINLEITUNG

### *1.1 Entwicklung eines Arzneimittels*

Die Entwicklung eines Arzneimittels (Abb. 1.1) beginnt mit der chemischen Synthese von Substanzen bzw. der Extraktion und Anreicherung von Verbindungen aus biologischem Material (tierisches oder menschliches Gewebe, Pflanzendrogen, tierische und pflanzliche Zellkulturen). Die erste Prüfung auf Wirksamkeit, das sogenannte "Screening", soll aus einer Vielzahl von Verbindungen diejenigen Strukturen erkennbar machen, die potentiell als Pharmaka eingesetzt werden können. Als Entscheidungskriterien lassen sich dafür die Ergebnisse von Ganztier-Untersuchungen oder auch von Experimenten mit isolierten Organen, Gewebshomogenaten, kultivierten Zellen, subzellulären Strukturen oder gereinigten Makromolekülen (z.B. Enzymen) heranziehen. Substanzen mit den gewünschten Wirkungen in den verwendeten Modellen werden weiterführenden Prüfungen unterzogen, die zumeist gesetzlichen Auflagen bzw. Richtlinien unterliegen.

Die Arzneimittelgesetze und die daraus abgeleiteten Richtlinien schreiben für alle neuen Arzneimittel vor, welche tierexperimentellen Untersuchungen zur Klärung welcher Fragestellung durchgeführt werden müssen. Die Bestimmung der Toxizität einer neuen Substanz, vor allem aber der Verträglichkeit bei chronischer Anwendung, Aussagen über Resorption, Verteilung und Elimination, Erkenntnisse über besondere Empfindlichkeit bestimmter Organe und die differenzierte Betrachtung der Wirkung auf Herz, Nervensystem, Niere, Hormonsystem u.a. sind auch heute noch nur durch Experimente am intakten Ganztier mit ausreichender Sicherheit möglich.

An diese sogenannten "präklinischen Untersuchungen" schließen sich die klinischen Prüfungen an. Wenn schließlich an einer ausreichend großen Zahl von Patienten die Wirksamkeit und Verträglichkeit des potentiellen Pharmakons - auch im Vergleich mit bisher verwendeten Arzneimitteln - statistisch abgesichert worden sind, kann das Bundesgesundheitsamt einem Antrag auf Zulassung dieses neuen Pharmakons entsprechen.



**Abb. 1.1: Entwicklung eines Arzneimittels**  
*Weniger als 1 % der synthetisierten oder aus biologischem Material gewonnenen Substanzen erreichen die Phasen der klinischen Prüfung*

## 1.2 Möglichkeit der Reduzierung von Tierversuchen

Betrachtet man nun das System der Arzneimittelentwicklung unter dem Aspekt, die Anzahl der verwendeten Versuchstiere zu reduzieren, sind die Bemühungen um eine gezieltere Synthese potentieller Wirkstrukturen ein möglicher Schritt. Unter Einbeziehung von neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen über die Struktur der Zielmoleküle potentieller Pharmaka und der computergraphischen Darstellung vom biologischem Signalempfänger (Rezeptor) und potentielltem Wirkmolekül unter dem Oberbegriff einer "rationalen Synthesepaltung" kann die Anzahl der zu prüfenden Substanzen und damit auch der zur Prüfung herangezogenen Versuchstiere reduziert werden.



Im Primär-Screening, bei dem es um die Trennung potentiell wirksamer Prüfsubstanzen von unwirksamen geht, erweisen sich in der Regel 95 - 99 % der getesteten Verbindungen als nicht weiter verfolgenswert. Gelingt es, im Screening die Ganztier-Untersuchungen durch In-vitro-Prüfungen zu ersetzen, kann eine deutliche Reduktion der Anzahl von Versuchstieren erzielt werden. Die Verwendbarkeit einer nach den Ergebnissen des In-vitro-Screenings als potentiell wirksam eingestuften Substanz muß jedoch anschließend in geeigneten Ganztiermodellen bestätigt werden. Diese Notwendigkeit ergibt sich auch aus der Tatsache, daß das In-vitro-Experiment keine Aussage darüber zuläßt, ob die Substanz den Wirkort in vivo überhaupt erreicht, d.h. ob sie möglicherweise schlecht resorbiert oder sehr schnell metabolisiert wird, und wie der Organismus mit seinen vielfältigen Regulationsprozessen auf den pharmakologischen Eingriff reagiert.

Auch im Rahmen von sicherheitspharmakologischen, pharmakokinetischen und toxikologischen Untersuchungen können Prüfungen an schmerzfreier Materie einen Teil der bisher noch notwendigen Tierversuche ersetzen und finden bereits Verwendung; dabei ist an Prüfungen auf Verträglichkeit von Pharmaka und an die Untersuchung auf erbutschädigende Wirkung zu denken. Computersimulationsmodelle stehen noch vor ihrer Bewährungsprobe.

### ***1.3 Vergleich In-vivo-/In-vitro-Prüfung beim Screening*** ***(Abb. 1.2, 1.3)***

Eine Entscheidung über die Vorgehensweise beim Screening setzt eine kritische Bewertung der Vor- und Nachteile der In-vivo- bzw. In-vitro-Techniken voraus.

Für Ganztier-Untersuchungen muß eine Vielzahl von Tieren, eingeteilt in eine Kontroll- sowie in Substanz- und Vergleichsgruppen, eingesetzt werden, um trotz individueller Reaktion des Einzeltiers zu eindeutigen Ergebnissen zu kommen. Deutlich kostengünstiger ist die Prüfung mit Hilfe von Organen, Zellen oder subzellulären Strukturen, mit denen die zu prüfende Substanz in Wechselwirkung treten und ihre Wirkung entfalten soll. Im allgemeinen reicht eine einzige

Gewebspräparation aus, um eine große Menge an Prüfsubstanzen auf potentielle Wirksamkeit zu überprüfen.

Bei Ganztier-Untersuchungen kann in der Regel keine Aussage über den Mechanismus der Wirkung von Substanzen getroffen werden; manche potentiellen Pharmaka sind aufgrund ihres Angriffspunktes therapeutisch nicht nutzbar oder mit erheblichen Nebenwirkungen behaftet. So kann z.B. eine an und für sich gewünschte Blutdrucksenkung auf einer Minderung der Herzleistung beruhen, die die Weiterentwicklung einer solchen Substanz unattraktiv erscheinen läßt. Auch zeigen z.B. zelltoxisch wirkende Substanzen häufig gute Wirkung in Ganztier-Entzündungsmodellen. Bei In-vitro-Untersuchungen wird mit dem "Design" des Modells der Angriffspunkt einer potentiellen Wirksubstanz vorgegeben und damit die Chance eröffnet, relativ selektiv wirkende Pharmaka zu finden. Oft reicht bereits die Bindung einer zu prüfenden Substanz an die vorgegebenen Strukturen aus, um sie als potentiell wirksam einzustufen und von den nicht bindenden, also unwirksamen Substanzen zu diskriminieren.

Allerdings kann man andererseits bei diesem Vorgehen nur potentielle Arzneistoffe auffinden, deren Wirkprinzip vorstellbar und vorzugeben ist; d.h. die Entdeckung völlig unerwarteter neuer Prinzipien wird dabei äußerst unwahrscheinlich.

Für das Ganztier-Experiment werden - je nach Größe der Versuchstiere - relativ große Substanzmengen benötigt. Dagegen bieten der geringe Substanzbedarf, die hohe Empfindlichkeit und der große Probendurchsatz bei In-vitro-Untersuchungen auch die Möglichkeit, Rohextrakte aus Pflanzendrogen oder Pflanzenzellkulturen zu prüfen, in denen die eigentliche Wirkstruktur nur etwa 1 % der Inhaltsstoffe ausmacht.

Tierversuche erlauben aber im Gegensatz zur In-vitro-Prüfung eine qualitative Aussage über die Resorption und das Erreichen für die Wirkung ausreichender Plasmaspiegel (Bioverfügbarkeit), wenn sich eine Prüfsubstanz nach oraler Applikation als wirksam erweist. Außerdem können in tierexperimentellen Untersuchungen auch Substanzen gefunden werden, die erst nach Biotransformation, also nach Metabolisierung im Organismus,

ihre Wirkung entfalten, daher sogenannte "Prodrugs" darstellen. Solche Substanzen können beim In-vitro-Screening nicht erfaßt werden.

Die Vorgabe des Wirkmechanismus, der geringe Substanzbedarf, die oft hohe Empfindlichkeit, die Möglichkeit eines hohen Probendurchsatzes, also einer kostengünstigen Prüfung, und nicht zuletzt der Tierschutzgedanke stellen jedoch deutliche Vorteile des In-vitro-Screenings dar; Aussagen über Resorption, Biotransformation und Bioverfügbarkeit müssen dann nur noch für verfolgenswerte Substanzen in Tierexperimenten gewonnen werden.

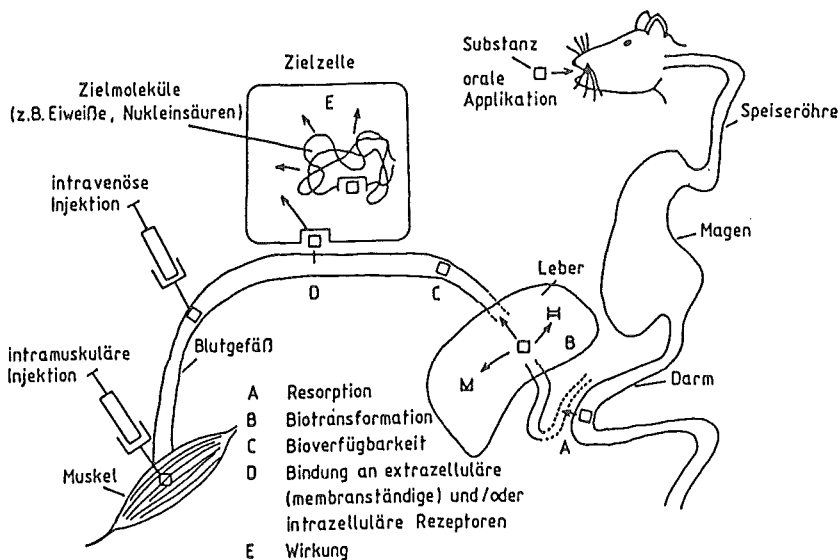


Abb. 1.2: Bei In-vivo-Untersuchungen erreicht die zu prüfende Substanz über die Blutbahn das Zielorgan bzw. die Zielzellen, um dort an extrazelluläre (membranständige) und/oder intrazelluläre Rezeptoren zu binden und so eine Wirkung auszulösen. Wird die Substanz oral gegeben, stellen die Aufnahme über den Darm (Resorption) und die Passage der Leber erste Hindernisse dar. Manchmal findet bereits bei der ersten Passage der Leber eine so ausgeprägte biochemische Veränderung der Substanz (Biotransformation) statt, daß keine für die Wirkung notwendigen Plasmaspiegel ("Bioverfügbarkeit") der Substanz mehr erreicht werden, manchmal wird aus einem sogenannten "Prodrug" in der Leber erst die eigentliche Wirkstruktur gebildet.

## Zielzelle

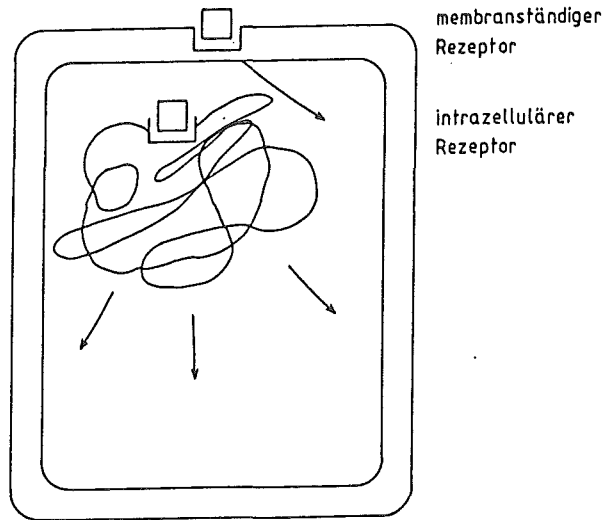


Abb. 1.3: Bei In-vitro-Untersuchungen arbeitet man ausschließlich mit dem Zielorgan, Zielzellen oder subzellulären Strukturen. Oft reicht bereits der Nachweis der Bindung einer Substanz an membranständige oder intrazelluläre Rezeptoren aus, um sie als potentiell wirksam einzustufen und von anderen unwirksamen zu unterscheiden.

### 1.4 Unser Projekt "Pharmakologische Untersuchungen in vitro - Alternativen zum Tierversuch"

Das Projekt "Pharmakologische Untersuchungen in vitro - Alternativen zum Tierversuch", das im September 1983 gestartet wurde, hatte das Ziel, Tests an "schmerzfreier Materie" zu entwickeln, die für das Screening potentieller Pharmaka eingesetzt werden können und ebenso gut wie Ganztier-Experimente die Einteilung in die Kategorien "wirksam" oder "unwirksam" bzw. "verfolgenswert" oder "nicht verfolgenswert" erlauben. Dabei konzentrierte man sich auf In-vitro-Modelle zur Auffindung

- antiphlogistisch und immunregulatorisch wirksamer Substanzen
- antiatherosklerotisch wirksamer Substanzen
- kardiovaskulär und psychotrop wirksamer Substanzen (Rezeptorbindungsuntersuchungen)
- antiparasitär wirksamer Substanzen.

#### **1.4.1 Strategie**

Das Vorgehen orientierte sich am Ziel des Projektes, die Gleichwertigkeit von ausgewählten etablierten Ganztier- und zu entwickelnden In-vitro-Experimenten für das Auffinden von Wirkstoffen zu belegen und besonders die Vorteile des In-vitro-Screenings herauszustellen. Basierend auf neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen über mögliche Ursachen von Erkrankungen waren In-vitro-Modelle zu konzipieren, das experimentelle "Design" zu erarbeiten, die Wirksamkeit von Referenzsubstanzen, d.h. schon bekannten Arzneistoffen, in dem jeweiligen Prüfsystem zu belegen und die Eignung für routinemäßiges Screening zu zeigen. In einem zweiten Schritt war für Referenz- und Prüfsubstanzen nachzuweisen, daß die in vitro erzielten Ergebnisse gut mit den in vivo, also in einem etablierten Tiermodell, erhobenen Befunden korrelierten, d.h., daß die In-vitro-Prüfung das In-vivo-Screening ersetzen kann.

#### **1.4.2 Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse**

Die erzielten Ergebnisse sind in den Kapiteln 2 bis 5 ausführlich dargestellt. Für jedes entwickelte Testverfahren wird einleitend kurz und allgemein verständlich das Prinzip und die Aussagemöglichkeit erläutert. Es folgt eine Beschreibung der benutzten Materialien und eingesetzten Methoden, die so detailliert gehalten ist, daß sie als "Kochbuch" betrachtet werden kann und ohne wesentliche Probleme nachvollziehbar sein müßte. Damit soll im Sinne des Projektes eine schnelle und allgemeine Verbreitung der von uns entwickelten Methoden möglich werden. Da diese Verfahren im Laufe des Projektes optimiert worden sind, ist es in einigen Fällen möglich, daß Experimente und Ergebnisse beschrieben werden, die mit einem anderen Versuchsdesign, als unter "Material und Methoden" angegeben ist, erarbeitet worden sind. Daher enthalten die Legenden zu den Tabellen und Abbildungen noch jeweils eine kurze Beschreibung des gewählten experimentellen Designs.

Der Ergebnis- und Diskussionsteil ist im wesentlichen als "Werkstattbericht" verfaßt, soll also nicht, wie in Publikationen üblich, in idealisierter - und oft nicht nachvollziehbarer - Weise "Highlights" präsentieren, sondern einen Über-

blick über das vermitteln, was experimentell erarbeitet worden ist und welche Probleme jeweils aufgetreten sind. So werden, um die Bandbreite möglicher Ergebnisse und Interpretationen abzudecken, tabellarisch und textlich auch Ergebnisse präsentiert, die mit Substanzen aus der "Nattermann-Küche" gewonnen worden sind.

Unserer Meinung nach erlaubt eine solche Darstellung der Ergebnisse mit detaillierter Diskussion den Wissenschaftlern in anderen Pharmaunternehmen, basierend auf unserer Arbeit die beschriebenen Testverfahren weiterzuentwickeln, zu optimieren oder zu modifizieren, um sie auf die jeweilige Problemstellung zu adaptieren.

Ein besonderes Problem stellte die In-vitro-/In-vivo-Korrelation dar, d.h. der Nachweis, daß die von uns etablierten In-vitro-Modelle bekannte und eingesetzte Tiermodelle ersetzen können. In einigen Fällen gab es gute, in anderen Fällen kaum eine Korrelation. Häufig ließ sich die fehlende Korrelation mit den pharmakokinetischen Eigenschaften und/oder einem ausgeprägten Metabolismus der jeweiligen Substanz in vivo erklären. So wurde uns bereits während des Verlaufs des Projektes klar, daß das Ziel, jeweils eine In-vitro-/In-vivo-Korrelation aufzuzeigen, falsch gewählt war. Der Einsatz von In-vitro-Modellen beim Screening anstelle von In-vivo-Modellen verlangt eine andere Denkweise und das Bewußtsein, daß hier zumeist Substanzen gefunden werden, deren Wirkung einem bestimmten Mechanismus folgt, daß damit aber alle Substanzen als nicht wirksam aussortiert werden, die erst nach Metabolisierung in ihre eigentliche Wirkstruktur überführt werden bzw. die gewünschte Wirkung nach einem anderen Mechanismus ausüben. Wie schon in den vorhergehenden Kapiteln diskutiert, erlaubt eine gefundene In-vitro-Wirksamkeit keine Aussage darüber, ob die Substanz absorbiert wird und/oder metabolisch so stabil ist, daß im Plasma oder am Zielorgan genügend hohe Konzentrationen erreicht werden können.

Die Frage nach der metabolischen Stabilität kann jedoch durch eine zusätzlich In-vitro-Untersuchung der Substanzen durch Inkubation in Gegenwart eines Kofaktoren-Gemisches und einer Mikrosomenpräparation aus Leber (z.B. aus Rattenleber) wenigstens teilweise beantwortet werden. Nach Extraktion lassen

sich Muttersubstanz und entstandene Metabolite hochleistungsflüssigkeitschromatographisch auftrennen und quantifizieren. Solche Untersuchungen, die nicht Gegenstand dieses Projekts waren, stellen eine weitere "Auslese" und eine notwendige Ergänzung zu den beschriebenen "In-vitro-Prüfungen" auf pharmakologische Wirksamkeit dar.

#### *1.4.3 Auswirkungen des Projekts auf den Tierbedarf*

Im Rahmen der Arbeiten an dem Projekt "Pharmakologische Untersuchungen in vitro - Alternativen zum Tierversuch" konnte bei Nattermann in den Jahren 1983-1988 die Anzahl verwendeter Versuchstiere deutlich reduziert werden (Abb. 1.4). Das trifft besonders für die Ratte zu, die das klassische Versuchstier für pharmakologische Untersuchungen darstellt. Der vorübergehende Anstieg der Zahl verwendeter Mäuse ist auf den Bedarf an Maus-Makrophagen zurückzuführen, die für die Etablierung zahlreicher Modelle aus den Indikationsgebieten "Entzündung" und "Atherosklerose" unerlässlich waren. Da diese vor dem eigentlichen Test getötet wurden, sind sie im strengen Sinne nicht zu den Versuchstieren zu zählen. Im Verlauf des Projektes wurde jedoch versucht, viele dieser Tests unter Verwendung permanenter Makrophagen-Zelllinien durchzuführen, die in Kultur gehalten werden können, so daß ein weiterer Rückgang der Zahl verwendeter Mäuse zu verzeichnen war.

Wir glauben, daß die von uns entwickelten In-vitro-Modelle auch in anderen Unternehmen der pharmazeutischen Industrie zu einem Rückgang der Versuchstierzahl führen könnten.

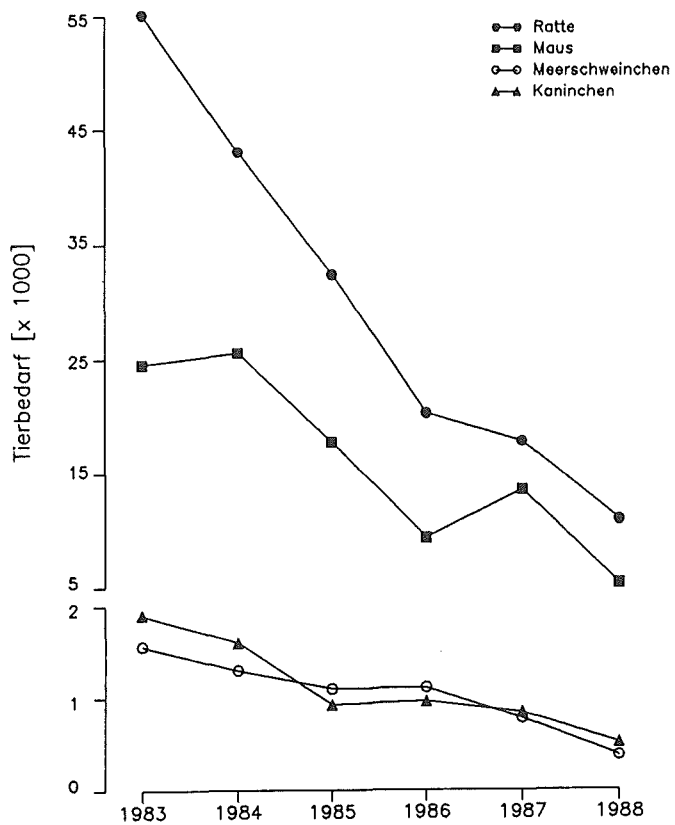


Abb. 1.4: Entwicklung des Tierbedarfes bei Nattermann unter dem Einfluß des BMFT-Projektes



## 2. IN-VITRO-TESTMODELLE ZUR ENTWICKLUNG ANTIPHLOGISTISCHER UND IMMUNREGULATORISCHER SUBSTANZEN

### 2.1 Einführung

Eine Entzündung ist die Reaktion eines Gewebes auf eine Zell- bzw. Gewebsschädigung, die durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst werden kann. Nach ihrem Verlauf wird eine Entzündung gewöhnlich entweder als akut oder als chronisch bezeichnet.

#### 2.1.1 Akute Entzündung

Während der akuten Entzündung, wie sie z.B. bei bakterieller Infektion oder kleinen Wunden auftritt, dominieren Gefäßprozesse. Die Kardinalzeichen der akuten Entzündung sind Rötung und Erwärmung - bedingt durch die arterioläre Gefäßerweiterung -, Schwellung - Ergebnis einer gesteigerten vaskulären Permeabilität und der Plasmaexsudation - und Schmerz. Bei den Zellen, die eine Hauptrolle bei der akuten Entzündung spielen, handelt es sich um polymorphkernige Granulozyten, die durch das Gefäßendothel in das Gewebe wandern und dort die eingedrungenen Organismen (z.B. Bakterien) phagozytieren. Bei diesem Prozess setzen sie Enzyme und Mediatoren frei; die zuletzt genannten sind hauptsächlich verantwortlich für die Symptome der Entzündung durch ihren Einfluß auf die Gefäße. Am Entzündungsprozess ist eine Reihe unterschiedlicher Mediatoren beteiligt.

Die Freisetzung bakterieller Endotoxine in das Blut führt zu einer Aktivierung des Komplementsystems, das ein integraler Bestandteil des Blutplasmas ist und dessen Aktivierung eine Kaskade von Peptiden mit meist enzymatischer Aktivität erzeugt, von denen jedes für die Bildung des nächsten Faktors verantwortlich ist. Für die Komplementaktivierung existieren zwei unterschiedliche Wege, der klassische und der alternative Weg. Eine ganze Reihe von Stimuli sind fähig, den alternativen Weg zu initiieren, während die Komplement-Aktivierung über den klassischen Weg durch Immunkomplexe ausgelöst wird; dieser Weg ist möglicherweise von entscheidender Bedeutung bei der rheumatoiden Arthritis. Beide Wege führen zur Spal-

tung des Faktors C3 mit der Bildung der Faktoren C3a und C3b und in einer anschließenden Reaktion von C5a (Abb. 2.1).

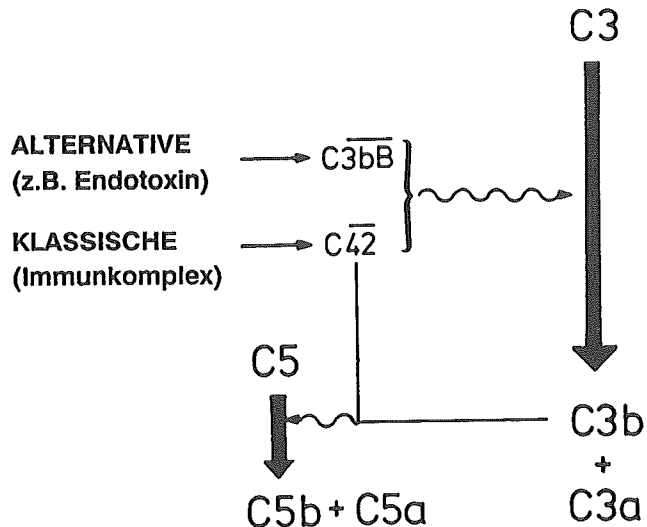


Abb. 2.1: Aktivierung des Komplementsystems

Unter den biologischen Aktivitäten dieser Faktoren, die für die Entzündung relevant sind, sind die Freisetzung lysosomaler Enzyme aus Makrophagen und die Degradierung von Immunkomplexen zu nennen, die beide durch C3b induziert werden, des weiteren die Degranulierung von Granulozyten, die Chemotaxis und die Freisetzung von Superoxid-Anionen ( $O_2^{\cdot-}$ ), die Erhöhung der Gefäßpermeabilität und die Ödembildung, die alle durch C5a induziert werden.

Neben C5a gibt es eine Reihe weiterer Agenzien, die Granulozyten stimulieren können; zu diesen gehören andere Peptide, bakterielle Produkte, Produkte und Partikel, die aus dem Gewebsuntergang resultieren, und Bakterien.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), unter ihnen  $O_2^{\cdot-}$ , können umgehend nach Stimulation von Granulozyten gebildet werden und stellen einen essentiellen Bestandteil der bakteriziden Aktivität dieser Zellen dar.  $O_2^{\cdot-}$ , das enzymatisch durch eine Membran-gebundene NADPH-Oxidase gebildet wird, kann zu Was-

Sauerstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dismutieren und führt über die Reaktion von diesen zwei ROS in Gegenwart eines Metallions (z.B.  $\text{Fe}^{2+}$ ) zur Bildung der hochreaktiven Hydroxylradikale ( $\text{OH}^\cdot$ ) und anderer reaktiver Produkte. Diese ROS zerstören die umgebenden Membranen und Gewebe und fördern die Entzündung (Abb. 2.2).

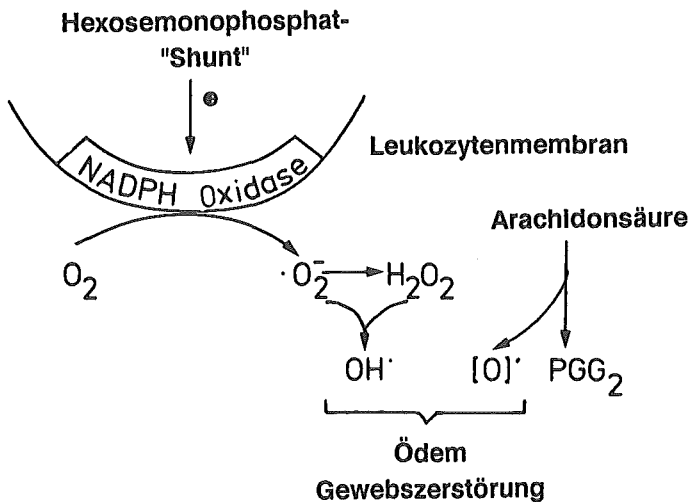


Abb. 2.2: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Leukozyten.

Ein wesentlicher Bestandteil der Membranphospholipide ist die Fettsäure "Arachidonsäure". Nach einer Leukozytenstimulation wird Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden durch Katalyse der Phospholipase  $\text{A}_2$  freigesetzt. Diese freigesetzte Arachidonsäure wird im Zytosol enzymatisch in eine große Anzahl von biologisch aktiven Oxidationsprodukten (Abb. 2.3) umgewandelt.

Die Prostaglandine (PGs) werden aus der Arachidonsäure durch das Enzym Cyclooxygenase gebildet, wobei am Anfang als instabile Zwischenprodukte die zyklischen Endoperoxide  $\text{PGG}_2$  und  $\text{PGH}_2$  und schließlich die stabileren Formen  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,

$\text{PGI}_2$  (Prostazyklin) und das instabilere Thromboxan  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) entstehen.

Das wichtigste bei Entzündungsprozessen anzutreffende Cyclooxygenase-Produkt - und dies gilt sowohl für die akute als auch für die chronische Entzündung - ist  $\text{PGE}_2$ .  $\text{PGE}_2$  liegt im entzündlichen Gewebe in hohen Konzentrationen vor und ist in diesen Konzentrationen in der Lage, Vasodilatation und Erytheme hervorzurufen, Plasmaexsudation und Schwellungen zu fördern und die Schmerzrezeptoren gegenüber nozizeptiven Stimuli zu sensibilisieren (Hyperalgesie). Somit ist  $\text{PGE}_2$  allein oder zusammen mit anderen Entzündungsmediatoren fähig, drei der klassischen Zeichen einer akuten Entzündung hervorzurufen.

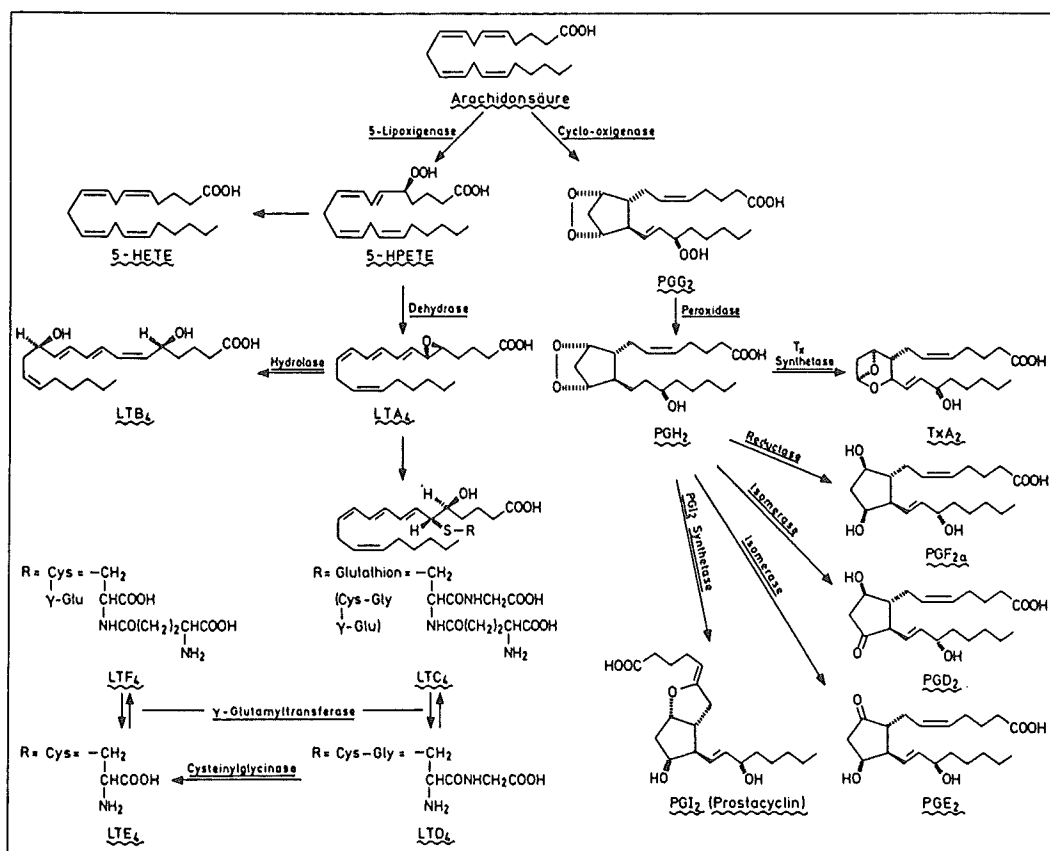


Abb. 2.3: Biologisch aktive Metaboliten der Arachidonsäure  
(aus: Parnham, M.J., Pharmazie heute, Band 3, Mai 1986)

Weiterhin wird die Arachidonsäure einer enzymatischen Oxidation durch eine Reihe von Lipxygenasen unterworfen, die eine Peroxidgruppe in verschiedene Positionen des Arachidonsäuremoleküls einführen. Die für die Entzündung bedeutsamsten Produkte sind diejenigen des 5-Lipxygenase-Weges, welche aus der 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5-HPETE) gebildet werden (Abb. 2.3). Biologisch bedeutender als das ebenfalls entstehende 5-Hydroxy-Derivat (5-HETE) sind die Leukotriene (LTs).

Für die akuten Entzündungsreaktionen sind die chemotaktischen und gefäßpermeabilitätserhöhenden Wirkungen des  $LTB_4$  von größter Bedeutung. Neben einer Stimulierung der Einwanderung von Granulozyten in entzündetes Gewebe bewirkt  $LTB_4$  auch eine Stimulierung der Freisetzung hydrolytischer Enzyme und anderer Entzündungsmediatoren aus diesen Zellen und fördert somit das weitere Fortschreiten der Entzündungsreaktion. Seit kurzem gibt es Hinweise dafür, daß  $LTB_4$  auch ein intrazellulärer Mediator für Stoffwechselvorgänge in Granulozyten ist, welche der "Stimulus-Sekretions-Kupplung" dienen. Die starke gefäßpermeabilitätserhöhende Aktivität des  $LTB_4$  scheint auch mit Granulozytenfunktionen zusammenzuhängen, da  $LTB_4$  in Abwesenheit von Granulozyten die Plasmaexsudation nicht stimulieren kann. Möglicherweise spielen für diese Vorgänge auch Interaktionen mit  $PGE_2$  eine Rolle, da  $PGE_2$  die  $LTB_4$ -induzierte Plasmaexsudation steigert.

Neben der Freisetzung von Arachidonsäure führt die Stimulation des Phospholipid-Stoffwechsels der Membranen zur Synthese des "platelet activating factor" (PAF). Dieses Ether-Phospholipid (Abb. 2.4) hat verschiedene Eigenschaften, von denen die Fähigkeit, Granulozyten zu stimulieren, von besonderer Bedeutung für die Entzündung ist, da daraus die Aggregation, eine gesteigerte Beweglichkeit (Chemokinese), die  $O_2^{\cdot -}$ -Produktion und die Freisetzung lysosomaler Enzyme resultieren.

Bei der Entwicklung von In-vitro-Testsystemen für die Auffindung von Substanzen, die antiinflammatorische Eigenschaften besitzen und den akuten entzündlichen Prozess beeinflussen könnten, ist es notwendig, der Vielfalt der zellulären und enzymatischen Reaktionen beim Entzündungsprozess durch eine Palette geeigneter Modellreaktionen Rechnung zu tragen. Erst

die In-vivo-Prüfung und möglicherweise sogar erst die Prüfung am Patienten kann dann den Beweis erbringen, daß die Reaktion, die durch die betreffende Substanz beeinflußt wird, tatsächlich für den jeweiligen Krankheitsprozess eine entscheidende Bedeutung hat. Die pro-inflammatorischen Effekte vieler Mediatoren wurden ausgiebig in In-vitro- und In-vivo-Modellen untersucht und bewiesen. Ob die dazu jeweils notwendigen Konzentrationen jedoch bei entzündlichen Erkrankungen erreicht werden oder ob durch das Wechselspiel der verschiedenen Mediatoren sich eine modifizierte Situation darstellt, die im Experiment nicht zu fassen ist, bleibt ungeklärt, bis Ergebnisse weiterer Untersuchungen - insbesondere aus klinischen Studien - vorliegen.

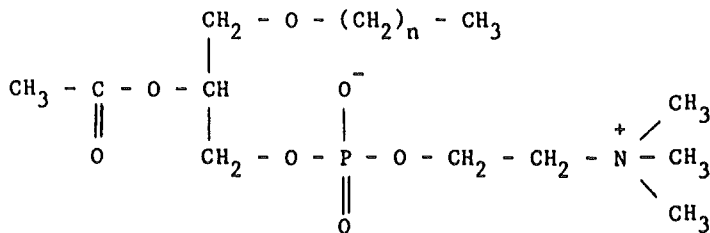


Abb. 2.4: Strukturformel von PAF ( $n=15$  oder  $n=17$ )

### 2.1.2 Chronische Entzündung

Neben den Symptomen einer akuten Entzündung ergeben sich im Verlauf chronischer Entzündungen an bestimmten Prädispositionsstellen, z.B. an Gelenken (chronische Polyarthrit) oder arteriellen Gefäßen (Lupus erythematodes), ausgedehnte Destruktionen und überschießende reparative Prozesse, die zu einem Verlust normaler Funktionen führen können.

Als Ursache insbesondere der chronischen Polyarthrit wird ein multifaktorielles Geschehen angenommen, wobei genetische, immunologische und biochemische Aspekte diskutiert werden. Als wichtige Mediatoren, die zur Chronizität der Entzündung

beitragen, werden übereinstimmend immunologische Faktoren angesehen. Entsprechend den grundsätzlichen immunologischen Abwehrmechanismen kommt es zur Veränderung der humoralen und der zellulären Immunabwehr. So findet sich bei der progredient chronischen Polyarthrit der sogenannte Rheumafaktor, ein 19-S-Immunglobulin, das gegen autologes 7-S-Immunglobulin G gerichtet ist. Außerdem kommt es auf zellulärer Ebene zu einem Ungleichgewicht verschiedener T-Zell-Subpopulationen. Diese Befunde weisen auf eine Fehlsteuerung humoraler und zellulärer Immunregulationen im Verlauf chronisch-entzündlicher Erkrankungen hin. Es erscheint daher angebracht, sowohl nach humoralen als auch nach zellulären Immunregulationen zu suchen, die das Gleichgewicht der Immunabwehr rekonstituieren können.

Der Aktivitätszustand der Lymphozyten kann bestimmt werden durch Messung ihrer Proliferationsrate nach Stimulierung mit einem sogenannten Mitogen. Durch die Verwendung selektiver Mitogene kann die Selektivität des Tests gesteigert werden, so z.B. für T-Zellen, die ihren Namen nach ihrer Abhängigkeit vom Thymus bekommen haben. T-Lymphozyten werden durch Antigene aktiviert, die ihnen durch Makrophagen in Anwesenheit des Cytokins Interleukin-1 (IL-1) präsentiert werden. IL-1 stimuliert die Bildung von IL-2 durch T-Lymphozyten, wodurch die weitere Proliferation dieser Zellen beschleunigt wird. Zusätzlich hat Interleukin-1 noch andere für die chronische Entzündung wesentliche Eigenschaften, so z.B. die Stimulierung der Freisetzung von  $\text{PGE}_2$  und Kollagenase aus Fibroblasten, die Steigerung des Chondrozyten-Metabolismus und die Synthese von "acute phase proteins" in der Leber.

Der zweite bedeutende Zelltyp der Immunantwort sind die B-Zellen, die sich zu Immunglobulin-synthetisierenden Plasmazellen und "Gedächtniszellen" differenzieren können. Diese Zellen können als Effektoren der humoralen Immunität angesehen werden. Die Fähigkeit der Plasmazellen, Immunglobuline (Ig) zu synthetisieren, kann zum Nachweis antikörperbildender Zellen genutzt werden, wobei durch ein spezifisches Antigen die Ig-Synthese stimuliert und nach einer bestimmten Zeit die Zahl der antikörperbildenden Zellen quantifiziert wird.

Die Induktion von Ig-Antikörpern gegen endogene Proteine und andere Strukturelemente von Zellen und Gewebe führt zur Autoimmunität über die Bildung von Immunkomplexen zwischen Struktur-Antigen und Autoantikörpern. Dieser Prozess spielt sich bei der rheumatoiden Arthritis und einem weiten Spektrum anderer chronischer entzündlicher Erkrankungen ab.

Während Lymphozyten die Immunantwort initiieren und aufrechterhalten, haben Makrophagen eine bedeutende Funktion für die Antigenpräsentation und die Zell-zu-Zell-Interaktion. Sie präsentieren die Antigenmoleküle den T-Lymphozyten, wodurch die T-Zell-Stimulation erfolgt. Diese T-Zell-Makrophagen-Interaktion ist genetisch in der D-Region des Histokompatibilitätskomplexes determiniert. Außerdem sind Makrophagen in die T-B-Zell-Interaktion eingeschaltet, d.h. T-Helferzellen benötigen die Anwesenheit von Makrophagen, um B-Zellen in antikörperbildende Zellen umzuwandeln.

Neben diesen genannten Funktionen bei der Immunabwehr kommen den Makrophagen noch weitere bedeutungsvolle Aufgaben zu: Phagozytose, Zytotoxizität und Sekretion.

Die Phagozytose richtet sich entweder gegen körpereigene, aber geschädigte Komponenten oder gegen körperfremde Partikel (Mikroorganismen). Die Erkennung dieser phagozytierbaren Partikel erfolgt entweder durch Rezeptoren für Immunglobulin und Komplement bei opsonisierten Mikroorganismen oder durch Oberflächenstrukturen, die eine Unterscheidung zwischen "selbst" und "nicht-selbst" erlauben.

Zytotoxizität von Phagozyten ist das extrazelluläre Abtöten anderer Zellen, wenn diese als fremd oder geschädigt erkannt werden.

Die Sekretion d.h. die Freisetzung biologisch aktiver Produkte, umfaßt so unterschiedliche Komponenten wie Prostaglandine, Leukotriene, Komplementfaktoren, reaktive Sauerstoffmetabolite, "platelet activating factor" (PAF), verschiedene Enzyme und Wachstumsfaktoren, die andere Zellen regulieren (z.B. auch Fibroblasten). Zu den sezernierten Enzymen gehören unter anderem  $\beta$ -Glucuronidase, Kollagenase und Elastase.

Aus diesen Erkenntnissen über die chronische Entzündung kann abgeleitet werden, daß Substanzen, die auf die humorale und zelluläre Immunantwort oder auf verschiedene Makrophagenfunk-



tionen wirken, potentiell antiinflammatorisch und damit anti-degenerativ wirksam sein könnten.

## 2.2 Lymphozytenstimulation

### 2.2.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit

Durch Gradientenzentrifugation (Methode nach Boyum, 1976) gewonnene Humanlymphozyten können durch Mitogene Concanavalin A (ConA), Pokeweed-Mitogen (PWM), Leukoagglutinin (LAG) zur Proliferation angeregt werden, wobei je nach Wahl des Mitogens definierte Lymphozytenpopulationen stärker als andere beteiligt sind. So lassen sich durch ConA und LAG in erster Linie T-Lymphozyten stimulieren, während durch PWM besonders die Proliferation von B-Lymphozyten, und in geringerem Maße die von T-Lymphozyten induziert wird. In Gegenwart von Testsubstanzen kann diese polyklonale Aktivierung unbeeinflusst, unterdrückt oder potenziert werden, wobei der Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin ein Maß für die Proliferation der Lymphozyten darstellt (Methode nach Mishell und Shiigi, 1980). Der Effekt der Prüfsubstanzen wird durch den Stimulationsindex

$$\text{SI} = \frac{\text{inkorporiertes } ^3\text{H-Thymidin in Gegenwart von Substanzen [dpm]}}{\text{inkorporiertes } ^3\text{H-Thymidin in Abwesenheit von Substanzen [dpm]}}$$

ausgedrückt. Ein  $\text{SI} > 1$  bedeutet eine Potenzierung, ein Wert  $< 1$  eine Unterdrückung der Stimulation.

Dieses Modell eignet sich als erster, vorgeschalteter Screeningtest zur Prüfung des Effektes von Substanzen auf humane periphere Lymphozyten. Die Modulation von Elementen des humoralen wie zellulären Immunsystems könnte ein wesentlicher Faktor bei der Therapie chronisch-entzündlicher Erkrankungen sein.

### 2.2.2 Material und Methoden

#### 2.2.2.1 Reagenzien

RPMI-Medium

Trockenpulver RPMI-Medium (Flow 10-601-20) mit 50 ml Aqua bidest. anlösen und zusätzlich zugeben:

15 mmol/l Hepes-Puffer (Flow 15-884-13)  
100 I.E./ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin } (Flow 16-700-49)  
4 mmol/l Glutamin (Boehringer Mannheim 210-277)  
18 mmol/l NaHCO<sub>3</sub> (Merck 6323)  
50 µmol/l 2-Mercaptoethanol (Merck 805740)  
mit Aqua bidest. auf 5 l auffüllen, bei -20 °C aufbewahren.

RPMI/10 % FKS (Flow 29-101, 1 h bei 56 °C hitzeinaktiviert)

Mitogene: ConA (Difco 3351-56)  
LAG (Pharmacia 17-0630-01)  
PWM (Gibco 670-5360)

<sup>3</sup>H-Thymidin (Amersham TRK.296)

Ficoll-Paque (Pharmacia  $\delta=1,077$  g/ml)

#### **2.2.2.2 Präparation der humanen peripheren Blutleukozyten (PBL)**

Die PBL werden aus dem heparinisierten (25 I.E./ml) Blut (20 ml) gesunder Spender gewonnen. Dazu wird das Blut auf 20 ml eines Ficoll-Paque-Gradienten geschichtet und 20 min bei 750 x g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Die PBL in der Interphase werden gewonnen, in 20 ml RPMI-Medium aufgenommen und 10 min bei 250 x g zentrifugiert. Nach nochmaligem Waschen wird das Sediment in 2 ml RPMI-Medium (10 % FKS) aufgenommen und die Lebendzellzahl in einer Thoma-kammer ermittelt (Vitalfärbung mit Acridinorange).

#### **2.2.2.3 Mitogenstimulation der PBL in vitro**

In Gegenwart des jeweiligen Mitogens, LAG (2 µg/ml), PWM (10 µg/ml) oder ConA (5 µg/ml), werden 10<sup>5</sup> PBL und gegebenenfalls Prüfsubstanz in einem Volumen von 150 µl RPMI/10 % FKS 72 h bei 37 °C in einer 5 % CO<sub>2</sub>-Athmosphäre in Mikrotiter-platten (Greiner 650101) inkubiert.  
20 h vor Ablauf der Inkubationszeit werden 0,5 µCi <sup>3</sup>H-Thymidin zugegeben.

#### ***2.2.2.4 Ernten der Zellen und Auswertung***

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen mittels eines Zellharvesters (Skatron) auf Filterpapier (Titertek, 78-115-05) gesammelt. Nach Trocknen der Filter werden diese in Zinsser-Minivials überführt und die  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaurate (dpm) nach Zugabe von je 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Zinsser Unisolve I) in einen Szintillations-Spektrometer (LKB) bestimmt. Der Substanzeffekt ergibt sich als Quotient aus der Einbaurate in Gegenwart und der Einbaurate in Abwesenheit von Testsubstanz.

Der jeweilige Wert resultiert dabei durch Mittelung von 4 Parallelkulturen abzüglich eines Leerwertes ohne Zellen. Die Auswertung erfolgt automatisch mit einem selbst entwickelten Computerprogramm (Programmiersprache: BASIC).

#### ***2.2.3 Ergebnisse und Diskussion***

Die in der Validierungsphase dieses Testmodells mit Referenzsubstanzen gewonnenen Ergebnisse zeigen sehr deutlich, daß Substanzen mit unterschiedlichsten Wirkmechanismen in diesem Modell eine Aktivität aufweisen (Tab. 2.1).

Während eine Beeinflussung des Arachidonsäure-Stoffwechsels durch nicht-steroidale Antiphlogistika, sowohl durch Inhibitoren der Cyclooxygenase (Indometacin) als auch kombinierte Lipoxigenase-Cyclooxygenase-Inhibitoren (Phenidon, NDGA) eher zu einem moderaten, nicht streng dosisabhängigen Effekt in diesem Modell führt, zeigen dagegen Substanzen mit Lymphokinmodulierenden Eigenschaften (Cyclosporin A), aber auch Zytostatika (Endoxan<sup>R</sup>) oder steroidale Antiphlogistika (Triamcinolon) reproduzierbare starke inhibitorische Aktivität.

Tab. 2.1: Die Wirkung verschiedener Verbindungen auf die Mitogen-induzierte Lymphozytenstimulation. Aus Blut isolierte Humanlymphozyten wurden 72 h in Gegenwart von 5 mg/l Concanavalin A (ConA), 2 mg/l Leukoagglutinin (LAG) oder 10 mg/l "pokeweed mitogen" (PWM, aus der Kermesbeere) inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden 0,5  $\mu$ Ci  $^3$ H-Thymidin ( $^3$ H-TdR) zugegeben. Gezeigt werden die Stimulations-Indizes (SI) für den  $^3$ H-TdR-Einbau durch die Lymphozyten. (Die Berechnung von SI ist in Kapitel 2.2.1 angegeben.)

Substanz	Konzentration	Stimulationsindizes		
		ConA	LAG	PWM
Indomethacin	10 <sup>-5</sup> [mol/l]	1,1	1,3	1,5
	10 <sup>-6</sup>	1,6	-	1,5
	10 <sup>-7</sup>	1,7	1,9	1,4
NDGA*	10 <sup>-5</sup>	1,0	0,9	1,1
	10 <sup>-6</sup>	0,8	1,0	0,8
	10 <sup>-7</sup>	1,3	1,4	1,0
Phenidon	10 <sup>-5</sup>	0,7	-	-
	10 <sup>-6</sup>	1,1	0,3	0,8
	10 <sup>-7</sup>	0,6	0,3	0,3
Penicillamin	10 <sup>-5</sup>	1,6	1,2	0,9
	10 <sup>-6</sup>	1,4	1,3	(3,7)
	10 <sup>-7</sup>	1,6	1,3	0,8
Chloroquin	10 <sup>-5</sup>	-	-	-
	10 <sup>-6</sup>	0,1	0,1	0,08
	10 <sup>-7</sup>	0,6	0,7	0,7
Triamcinolon	0,01 [mg/l]	0,2	0,06	0,5
	0,1	0,3	0,06	0,5
	1,0	0,5	0,1	0,8
Azothioprin	0,1	1,5	0,8	1,0
	1,0	1,1	0,6	1,2
	10,0	0,5	0,2	0,5

\* Nordihydroguajaretssäure

Tab. 2.1.: Fortsetzung

Substanz	Konzentration	Stimulationsindizes		
		ConA	LAG	PWM
Cyclophosphamid	1,0 [mg/l]	0,06	0,8	1,0
	10,0	0,03	0,8	1,0
	100,0	-	0,8	0,9
Auranofin	1,0	1,2	0,8	0,9
	10,0	1,2	0,9	0,9
	100,0	1,0	0,8	0,8
Levamisol	10 <sup>-5</sup> [mol/l]	1,6	1,2	1,1
	10 <sup>-6</sup>	1,3	1,0	1,1
	10 <sup>-7</sup>	1,3	1,1	1,0
Clofibrat	1,0 [mg/l]	1,3	1,0	0,9
	10,0	1,5	0,9	1,1
	100,0	1,6	0,8	1,1
Nicotinsäure	10 <sup>-5</sup> [mol/l]	1,7	1,1	1,1
	10 <sup>-6</sup>	1,2	1,0	0,9
	10 <sup>-7</sup>	1,3	1,0	1,1
Bestatin	10 <sup>-4</sup>	0,5	0,6	0,7
	10 <sup>-5</sup>	0,7	0,9	0,8
	10 <sup>-6</sup>	0,8	1,1	0,9
Cyclosporin A	0,03 [mg/l]	0,1	0,2	0,3
	0,1	0,1	0,1	0,2
	1,0	0,07	0,02	0,1

Insgesamt wurden während des gesamten Projektzeitraumes über 1000 Substanzen aus der chemischen Synthese oder Substanzgemische, die aus Pflanzenzellkulturen extrahiert worden waren, auf ihre Wirkung auf die Lymphozytenproliferation untersucht.

Von Interesse für weitergehende Untersuchungen in anderen Testmodellen waren sowohl Verbindungen, die eine starke inhibitorische Aktivität auf die Lymphozytenproliferation unabhängig vom Typ des "inducers" aufwiesen, also T- und B-Lym-

phozyten gleichermaßen beeinflussen, als auch partiell selektive Inhibitoren der durch Concanavalin A induzierten Proliferation der T-Zellen, wobei die Beeinflussung der durch PWM hervorgerufenen Induktion der B-Lymphozyten nicht oder deutlich schwächer ausgeprägt war (Tab. 2.2).

*Tab. 2.2: Selektive Hemmung der Proliferation von Humanlymphozyten durch 6 Testsubstanzen (Konz.  $10^{-5}$  mol/l) nach Concanavalin A (ConA)-induzierter Stimulation. Die Prozentangaben sind Mittelwerte aus 3 getrennten Untersuchungen.  
(LAG = Leukoagglutinin; PWM = "pokeweed mitogen")*

Substanz	Inhibition [%]		
	ConA	LAG	PWM
NAT 18-071-01	46	+23	31
NAT 18-092-1	46	54	39
NAT 18-107-1	59	51	-
NAT 18-233-2	45	54	33
NAT 18-313-2	47	27	36
NAT 18-850	44	7	1

Die in dem Testmodell der Lymphozytenstimulation in vitro gefundenen biologischen Aktivitäten ließen sich für eine Reihe von Testsubstanzen bei späteren In-vivo- bzw. Ex-vivo-Untersuchungen verifizieren.

So zeigten z.B. 8 von 10 Testsubstanzen sowohl in der PWM-induzierten Lymphozytenproliferation als auch in der humoralen Immunantwort ex vivo im Hämolyse-Plaque-Test in der Maus eine Hemmwirkung (Tab. 2.3).

Entsprechend ergab eine vergleichende Gegenüberstellung von Substanzwirkungen in der ConA-induzierten Lymphozytenproliferation und in der "graft-versus-host"-Reaktion, die ein T-Zell-abhängiges In-vivo-Modell darstellt, qualitativ eine gute Korrelation (Tab. 2.4).

Tab. 2.3: Vergleich der Effekte von Substanzen (100 mg/kg bzw. 10 mg/kg tägl. über 4 Tage) auf die Bildung von Hämolyse-Plaques *ex vivo* und die "pokeweed mitogen" (PWM)-induzierte Lymphozytenproliferation *in vitro*.

Substanz	Erhöhung (+) oder Inhibition (-) der Plaque-bildenden Zellen[%]		PWM-induzierte Lymphozytenproliferation IC <sub>50</sub> [μmol/l]
	100 mg/kg	10 mg/kg	
NAT 04-484	- 36	- 36	44
04-483	+ 15	+ 50	68
04-482	- 22	- 11	46
04-481	- 20	- 18	20
04-462	- 41	- 38	75
04-455	- 33	- 30	58
04-450	+ 18	- 20	34
04-440	- 46	- 37	58
04-172	- 39	- 22	36
04-157	- 37	- 44	60

Tab. 2.4: Gegenüberstellung der Effekte von Prüfsubstanzen auf die Graft-versus-Host-Reaktion und die ConA-induzierte Lymphozytenstimulation *in vitro*

Substanz	Einfluß auf die Graft-versus-Host-Reaktion		Einfluß auf die ConA-induzierte Lymphozyten-Proliferation	
	[mg/kg]	% Erhöhung(+) oder Inhibition (-)	[mol/l]	% Erhöhung (+) oder Inhibition (-)
Cyclosporin A	1,0	- 25	10 <sup>-9</sup>	- 20
	3,2	- 60	10 <sup>-8</sup>	- 30
	10,0	- 52	10 <sup>-7</sup>	- 80
Dexamethason	0,1	- 22	10 <sup>-7</sup>	- 79
	0,32	- 53	10 <sup>-6</sup>	- 83
	1,0	- 84	10 <sup>-5</sup>	- 88
Indometacin	0,32	- 9	10 <sup>-7</sup>	- 41
	1,0	- 11	10 <sup>-6</sup>	+ 32
Phenidon	10	+ 34	10 <sup>-7</sup>	- 7
	31,6	+ 28	10 <sup>-6</sup>	- 13
	100	- 46	10 <sup>-5</sup>	+ 10

Das Testmodell der Lymphozytenstimulation ist einfach, aber nicht sehr spezifisch und erlaubt keine Aussagen über den Wirkmechanismus der in diesem Modell aktiven Substanzen. In der Prüfhierarchie von potentiellen Wirksubstanzen für chro-



nisch entzündliche Erkrankungen ist es im Primärscreening angesiedelt, wo es äußerst rasch die Auffindung von Substanzen ermöglicht, die die Proliferation von Lymphozyten beeinflussen und somit potentielle humorale und/oder zelluläre Immunmodulatoren darstellen. Ein weiterer Vorteil dieses Testmodells ist der geringe Substanzbedarf, der es insbesondere für das routinemäßige Screening von Extrakten aus Pflanzenzellkulturen als besonders geeignet erscheinen läßt. So konnte für die kürzlich erstmals beschriebenen und antiinflammatorisch wirksamen Flavonoide Podoverin A, B und C auch eine dosisabhängige, relativ starke Hemmung der Lymphozytenproliferation gezeigt werden (Tab. 2.5, Abb. 2.5).

*Tab. 2.5: Vergleich der Hemmeffekte von Podoverin C in verschiedenen In-vitro-Testen und im CVF-induzierten Rattenpfotenödem in vivo.*

Versucht	IC <sub>50</sub> [µmol/l]	Inhibition bei 1 mg/kg [%]	
		i.v.	p.o.
Makrophagen CL	95		
Makrophagen Phagozytose	80		
Lymphozytenproliferation			
Con A	4		
LAG	5,5		
PWM	10		
5-Lipoxygenase	9,5		
12-Lipoxygenase	100		
Cyclooxygenase	22		
CVF-Pfotenödem	-	53	44

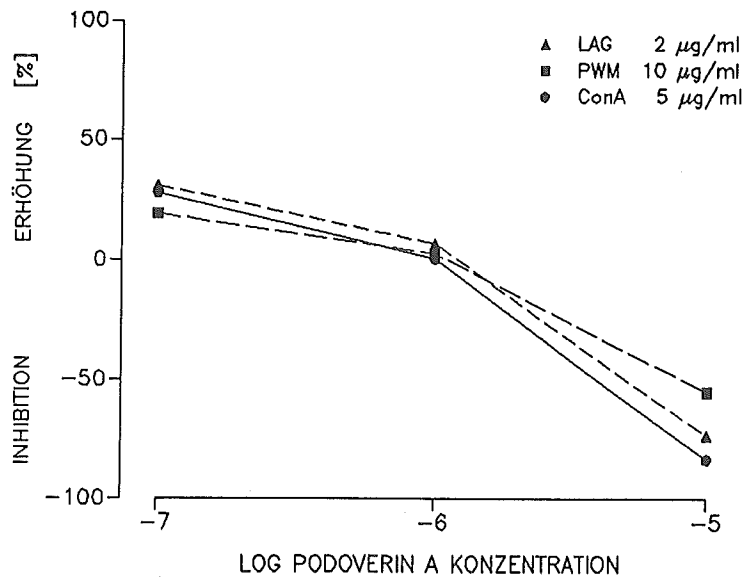


Abb. 2.5: Dosis-Wirkungs-Kurven für die Effekte von Podoverin A auf die Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation in vitro. Die Werte sind angegeben als prozentuale Zunahme (+) oder Hemmung (-) und aus 3 verschiedenen Untersuchungen ermittelt worden.

## **2.3 Immunglobulinsynthese**

### **2.3.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Durch Gradientenzentrifugation (Methode bei Boyum, 1976) gewonnene periphere Humanlymphozyten werden mit einem geeigneten Mitogen stimuliert; nach 5 Tagen wird die an das Kulturmedium abgegebene Menge an Immunglobulin G (IgG) mit Hilfe eines ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) quantifiziert.

Dieses Testverfahren macht Aussagen über den Einfluß von Substanzen auf die Entwicklung von B-Lymphozyten zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen und auf die Produktion von Immunglobulinen möglich, wobei allerdings der exakte Angriffspunkt der Substanzen nicht erkennbar wird. Die Modulation von Elementen des humoralen und zellulären Immunsystems könnte ein wesentlicher Faktor bei der Therapie chronisch-entzündlicher Erkrankungen sein.

### **2.3.2 Material und Methoden**

#### **2.3.2.1 RPMI-Medium und Puffer**

Trockenpulver RPMI-Medium (Flow 10-601-20) mit 50 ml Aqua bidest. anlösen und zusätzlich zugeben:

15 mmol/l HEPES-Puffer (Flow 15-884-13)  
100 I.E./ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin } (Flow 16-700-49)  
4 mmol/l Glutamin (Boehringer Mannheim 210-277)  
18 mmol/l  $\text{NaHCO}_3$  (Merck 6323)  
50 µmol/l 2-Mercaptoethanol (Merck 805740)  
mit Aqua bidest. auf 5 l auffüllen, bei -20 °C aufbewahren.

RPMI/10 % FKS (Flow 29-101, 1 h bei 56 °C hitzeinaktiviert)

Phosphatpuffer 0,1 mol/l, pH 7,4

Mischen der Stammlösungen

0,1 mol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck 6580)

0,1 mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck 6346)

und auf pH 7,4 einstellen.

PBS pH 7,4

100 ml 0,1 mol/l Phosphatpuffer

+ 8 g NaCl (Merck 6404)

mit Aqua dest. ad 1000 ml auffüllen

BSA-Puffer

1 % Rinderserumalbumin (Sigma A7030) in PBS-Waschpuffer

0,05 % Tween 20 (Merck 822184) in PBS

### ***2.3.2.2 Präparation der humanen peripheren Blutleukozyten (PBL)***

Die PBL werden aus dem heparinisierten (25 I.E./ml) Blut (20 ml) gesunder Spender gewonnen. Dazu wird das Blut auf 20 ml eines Ficoll-Paque-Gradienten geschichtet und 20 min bei 750 x g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Die PBL in der Interphase werden gewonnen, mit 20 ml RPMI-Medium aufgenommen und 10 min bei 250 x g zentrifugiert. Nach nochmaligem Waschen wird das Sediment in 2 ml RPMI-Medium (10 % FKS) aufgenommen und die Lebendzellzahl in einer Thoma-kammer ermittelt (Vitalfärbung mit Acridinorange).

### ***2.3.2.3 Stimulation der In-vitro-Immunglobulinsynthese***

PBL ( $4 \times 10^6$ /ml) werden in einem Endvolumen von 500 µl RPMI-Medium in Gegenwart von PWM (5 µg/ml) bei 37 °C in einer 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Nach 5 Tagen wird die stimulierte IgG-Synthese durch Messung des Kulturüberstandes mittels ELISA-Technik quantifiziert.

### ***2.3.2.4 ELISA zur Messung von humanem IgG***

Für den IgG-ELISA werden Flachboden-Mikrotiterplatten (Dynatech) über Nacht bei 4 °C mit 200 µl Kaninchen-Anti-Human IgG (Dynatech, DDIR-100-2B) beschichtet. Danach werden die Platten mit 1 % BSA in PBS nachbeschichtet (1 h bei RT). Nach 3maligem Waschen mit PBS/ Tween werden entweder 200 µl IgG-Standard (Human IgG, Miles 64-145-1;  $10^{-3}$ - $10^{-9}$  g/ml) bzw. stimulierter Kulturüberstand hinzugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS/Tween wird ein mit Alkalischer Phosphatase markierter, gegen humanes IgG gerichteter, Ziegenantikörper (Dynatech, DDIG-100-2F) zuge-

setzt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3maligem Waschen wird gebundenes Konjugat durch Reaktion mit 4-Nitrophenylphosphat (Merck, 6850; 1 mg/ml) und Abstoppen der Reaktion mit 3 mol/l NaOH durch Extinktionsmessung bei 405 nm quantifiziert.

### 2.3.3 Ergebnisse und Diskussion

Mittels ELISA-Technik konnte unter optimierten Kulturbedingungen im Überstand von Leukozyten-Kulturen nach Stimulation mit PWM humanes IgG nachgewiesen werden. Dabei wiesen Kulturen mit einer Zelldichte von  $4 \times 10^6$  PBL/ml die höchsten Syntheseraten auf (Tab. 2.6).

Tab. 2.6: Abhängigkeit der Immunglobulin-G (IgG)-Synthese *in vitro* von verschiedenen Zellkonzentrationen. Humanleukozyten aus Blut (PBL) wurden bei verschiedenen Zellkonzentrationen ( $2 \times 10^6$  -  $8 \times 10^6$  PBL/ml) 5 Tage lang inkubiert. Die Inkubate enthielten entweder das Medium allein oder das Medium mit Zusatz von 5 µg "pokeweed mitogen" (PWM)/ml. Nach 5 Tagen wurde aus den Überständen der Inkubationen der IgG-Gehalt mit Hilfe der ELISA-Technik bestimmt. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte von Zweifach-Inkubationen mit 3 verschiedenen PBL-Präparationen und angegeben als µg IgG/ml Zellkulturüberstand.

	sezerniertes IgG im Kulturüberstand	
	Medium [µg/ml]	Medium + PWM [µg/ml]
$2 \times 10^6$ PBL/ml	0,02	0,28
$4 \times 10^6$ PBL/ml	0,05	0,93
$8 \times 10^6$ PBL/ml	0,04	0,12

In PBL-Präparationen verschiedener Spender konnte jedoch trotz Erhöhung der Zellzahl bzw. Verlängerung der Inkubationszeit keine nennenswerte Synthese und Ausschüttung von IgG induziert werden (Tab. 2.7).

Tab. 2.7: Immunglobulin-G (IgG)-Synthese von Humanleukozyten (PBL) aus dem Blut verschiedener Spender in vitro. Menschliche PBL ( $4 \times 10^6$ /ml) verschiedener Spender wurden 5 Tage mit Medium allein bzw. mit Medium und Zusatz von 5 µg "pokeweed mitogen" (PWM) /ml inkubiert. Nach 5 Tagen wurde der Gehalt an IgG in den Überständen mit Hilfe der ELISA-Technik ermittelt. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte von Zweifachinkubationen für jeden Spender und angegeben als µg IgG/ml Zellkultur-Überstand.

Spender	sezerniertes IgG im Kulturüberstand		Reaktion auf PWM
	Medium [µg/ml]	Medium + PWM [µg/ml]	
1	0,08	0,09	-
2	0,02	1,27	+
3	0,04	1,02	+
1	0,14	0,03	-
4	0,01	0,03	-
5	0,01	0,47	+
6	0,05	1,80	+
7	0,10	0,51	+
8	0,07	0,04	-

Dieses Phänomen der "nonresponsiveness" erwies sich als Mitogen-unabhängig und konnte z.B. durch andere getestete Stimuli wie Staphylococcus aureus oder Protein A nicht beseitigt werden (Tab. 2.8).

Tab. 2.8: IgG-Synthese durch mononukleäre Humanleukozyten (PBL) von zwei unterschiedlichen Konzentrationen nach Induktion durch verschiedene Stimuli in vitro. Menschliche PBL ( $2 \times 10^6$  und  $4 \times 10^6$  PBL/ml) wurden 5 Tage bei 37 °C in einer befeuchteten 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Die Inkubate enthielten entweder das Medium allein oder das Medium mit Zusatz folgender Stimuli: "pokeweed mitogen" (PWM 1 mg/ml), Protein A (Prot A) aus Staphylococcus aureus (lyophilisiert) oder Formalin-behandelte Staphylococcus-aureus-Bakterien, Stamm Cowan I ("Pansorbin"-Zellen, 10 % w/v). Nach 5 Tagen wurde der IgG-Gehalt der Überstände mit Hilfe der ELISA-Technik bestimmt. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte von 3 PBL-Präparationen aus verschiedenen Spendern und angegeben als µg IgG/ml Zellkultur-Überstand ( $\pm$  Standardabweichung vom Mittelwert).

Stimulus	$4 \times 10^6$ PBL/ml	$2 \times 10^6$ PBL/ml
Medium	0,03 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,03
0,25 µl PWM/ml	0,29 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,09
2,50 µl PWM/ml	0,06 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,06
0,10 µg Prot A/ml	0,22 $\pm$ 0,10	0,09 $\pm$ 0,08
0,10 µl S.aureus/ml	0,08 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,06
1,00 µl S.aureus/ml	0,02 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01

Aufgrund der aufgetretenen experimentellen Schwierigkeiten und der beobachteten großen Schwankungsbreite der IgG-Sekretion nach Induktion erschien das Testsystem für Screening-Zwecke als nicht geeignet und wurde durch ein anderes Modell, die In-vitro-Immunisierung von Milz-Lymphozyten mit Schaf-Erythrozyten (Kap. 2.4), ersetzt.

## ***2.4 In-vitro-Immunisierung von Milz-Lymphozyten mit Schaf-Erythrozyten***

### ***2.4.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit***

Durch eine Co-Inkubation von Milzzellen der Maus mit Schaferythrozyten werden die für die antigenen Determinanten der Schaferythrozyten kompetenten Lymphozyten aktiviert und zuvor ruhende antigenspezifische B-Lymphozyten zur Antikörpersezer-nierung angeregt. Mit Hilfe des Hämolyse-Plaque-Testes wird die Anzahl der B-Zellen bestimmt, die Antikörper (überwiegend vom IgM-Typ) gegen Schaferythrozyten sezernieren, wobei die anti-Schaferythrozyten-sezernierenden B-Zellen in Gegenwart von Meerschweinchen-Serum als Quelle für die Faktoren des Komplement-Systems durch einen sogenannten hämolytischen Plaque in einer ansonsten dichten Erythrozyten-Suspension zwischen 2 Objektträgern imponieren. Nach Inkubation der Milzzellen mit Schaferythrozyten in Gegenwart von zu prüfenden Substanzen kann die Anzahl der Antikörper-sezernierenden B-Lymphozyten erniedrigt oder erhöht sein.

Dieses Testsystem erlaubt eine Aussage über den Einfluß von Substanzen auf die Entwicklung von B-Zellen zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen, wobei die Anzahl der Antigen-spezifischen und Antikörper-produzierenden Plasmazellen erfaßt wird. Die Modulation von Elementen des humoralen und zellulären Immunsystems könnte ein wesentlicher Faktor bei der Therapie chronisch-entzündlicher Erkrankungen sein.

### ***2.4.2 Material und Methoden***

#### ***2.4.2.1 Versuchstiere***

Es werden weibliche DBA-Mäuse (20-25 g), Charles River Wiga, eingesetzt.

Die Tiere werden in Makrolonkäfigen in klimatisierten Räumen bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h gehalten ( $T=22^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ ). Die Tiere erhalten eine Standarddiät (Altromin) und Trinkwasser ad libitum.

Als Erythrozytenspender dienen männliche und weibliche Schafe (Weidehaltung).



#### 2.4.2.2 Reagenzien und Puffer

##### RPMI-Medium

Trockenpulver RPMI-Medium (Flow 10-601-20) mit 50 ml Aqua bidest. anlösen und zusätzlich zugeben:

15 mmol/l Hepes-Puffer (Flow 15-884-13)  
100 I.E./ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin } (Flow 16-700-49)  
4 mmol/l Glutamin (Boehringer Mannheim 210-277)  
18 mmol/l NaHCO<sub>3</sub> (Merck 6323)  
50 µmol/l 2-Mercaptoethanol (Merck 805740)

mit Aqua bidest. auf 5 l auffüllen, bei -20 °C aufbewahren.

RPMI/10 % FKS (Flow 29-101, 1 h bei 56 °C hitzeinaktiviert)

##### Fütterungscocktail (nach Mishell und Dutton)

150 ml Essentielle Aminosäuren (Gibco 043-1130)  
75 ml Nicht-essentielle Aminosäuren (Boehringer Mannheim 210293)  
75 ml Glutamin (Boehringer MA 210-277)  
15 g Dextrose  
1050 ml RPMI-Medium  
pH 7,2 mit 1 mol/l NaOH, dann 225 ml 7,5 % NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (Gibco 043-5080) hinzugeben.  
Nach Sterilfiltration portionsweise bis zum Gebrauch bei -20 °C lagern.

##### Alsever-Lösung

2,05 g Glucose (Merck 8342)  
0,8 g Na-citrat (\* 2 H<sub>2</sub>O) (Merck 6447)  
0,055 g Citronensäure (Merck 244)  
0,42 g NaCl (Merck 6404)  
ad 100 ml Aqua dest. mit Citronensäure auf pH 6,1 einstellen, anschließend sterilfiltrieren.

Hank's Lösung (Gibco 042-4065)

Meerschweinchenkomplement (Behringwerke)

#### **2.4.2.3 Gewinnung von Schaferythrozyten (SRBC)**

Schafblut wird direkt mittels einer Spritze in sterilfiltrierte Alseverlösung im Verhältnis 1:1 aufgenommen. Die Erythrozyten müssen ca. 1 Woche bei 4 °C ruhen. Vor Gebrauch werden die Erythrozyten bei 4 °C, 750 x g, 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen noch 2 x mit Hank's Lösung gewaschen. Zuletzt wird das Sediment (1 ml gepackte Zellen) mit Hank's Lösung auf ein Volumen von 5 ml aufgefüllt, dies ergibt eine 20 %ige SRBC-Suspension.

#### **2.4.2.4 In-vitro-Immunisierung sensibilisierter Milzzellen**

Eine mit Schaferythrozyten (SRBC) immunisierte weibliche DBA-Maus wird 3 Tage nach der Primärimmunisierung in vivo (0,2 ml 5 % SRBC i.v.) unter Ethernarkose schmerzlos getötet. Die Milz wird steril entnommen und in RPMI-Medium suspendiert. Zur In-vitro-Restimulation werden 50 µl der Milzzellsuspension ( $4 \times 10^6/\text{ml}$ ), 50 µl 0,02 % SRBC und gegebenenfalls Testsubstanz mit RPMI/10 % FKS in einem Volumen von insgesamt 150 µl in Rundboden-Mikrotiterplatten (Greiner) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Während der 5tägigen Inkubation werden die Zellen 2 x mit jeweils 25 µl Fütterungscocktail versehen.

#### **2.4.2.5 Mikro-Plaque-Technik nach Cunningham**

Zwei Objektträger (26 x 75 mm) werden mit doppelseitigem Klebeband gegeneinander gedrückt, so daß 2 Felder ungefähr gleicher Größe entstehen. Das Gesamtvolumen der Kammer beträgt ca. 180 µl. Es werden 50 µl kultivierte Lymphozyten mit 20 µl 20 % SRBC in Gegenwart von 20 µl Meerschweinchen Komplement (1:5 verdünnt) und 100 µl Hank's Lösung in die vorbereiteten Kammern gefüllt. Nach Abschluß mit flüssigem Paraffin werden die Objektträger 1-2 h bei 37 °C feucht inkubiert, anschliessend werden die Antikörper-produzierenden Plasmazellen anhand der gebildeten Hämolysehöfe als sogenannte "Plaque forming cells" (PFC) pro 10<sup>6</sup> Milzzellen unter dem Mikroskop gezählt. Der Effekt der Testsubstanzen wird als relative Änderung (%) zum Kontrollansatz, d.h. in Abwesenheit von Prüfsubstanz, angegeben.

### 2.4.3 Ergebnisse und Diskussion

Unter optimierten Kulturbedingungen konnte in vitro eine SRBC-spezifische humorale Immunantwort induziert werden. In Gegenwart von Testsubstanzen war diese Antwort z.T. deutlich gehemmt (Tab. 2.9).

Die drei in Tabelle 2.9 genannten Testsubstanzen wurden ebenfalls auf ihre inhibitorische Wirkung in vivo nach intravenöser Injektion von  $4 \times 10^8$  SRBC und 4tägiger Behandlung mit der Testsubstanz geprüft. Tabelle 2.9 zeigt, daß die in vitro erhobenen Daten mit den In-vivo-Befunden qualitativ gut korrelieren.

Von den aus Pflanzenzellkulturextrakten gereinigten Verbindungen erwiesen sich die Flavonoide Podoverin A und C auch in dem Modell "In-vitro-Immunisierung von Milz-Lymphozyten mit Schafererythrozyten" als wirksam, wobei eine qualitativ gute Korrelation zu den Ergebnissen in der "Lymphozytenstimulation" zu erkennen ist (Tab. 2.10).

Die bei uns in der Laufzeit des Projektes erzielten Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß das in diesem Kapitel beschriebene Modell geeignet ist, den Effekt von Prüfsubstanzen auf die humorale Immunantwort zu studieren, und auch für das Primärscreening verwendet werden kann. Während bei der In-vitro-Untersuchung mit einer Mäusemilz bis zu 20 Substanzen getestet werden können, würde die In-vivo-Untersuchung pro Testsubstanz wenigsten 5 Tiere erfordern. Damit kann die Verwendung dieses In-vitro-Modells dazu beitragen, die Zahl der Versuchstiere beim Primärscreening zu reduzieren.

Tab. 2.9: Beeinflussung der Synthese Plaque-bildender Zellen (PFC) nach In-vitro- oder In-vivo-Immunisierung mit Schafererythrozyten (SRBC).

- 1)  $2 \times 10^5$  Milzzellen aus SRBC-behandelten weiblichen DBA/2-Mäusen wurden 4 Tage mit  $2 \times 10^5$  SRBC und den in RPMI-Medium gelösten Testsubstanzen inkubiert.
- 2)  $4 \times 10^8$  SRBC wurden i.v. injiziert. Die Testsubstanzen wurden 1 x tägl. über 4 Tage appliziert.

Testsubstanz	Immunisierung			
	[mol/l]	In-vitro- <sup>1)</sup> Inhibition(-) von PFC	[mg/kg/Tag]	In-vivo- <sup>2)</sup> Inhibition(-) oder Erhöhung (+) von PFC
		[%]		[%]
NAT 02-748	$10^{-4}$	- 41	100	- 46
	$10^{-5}$	- 72	10	- 37
	$10^{-6}$	- 72	1	+ 9
NAT 04-462	$10^{-4}$	- 66	100	- 40
	$10^{-5}$	- 84	10	- 38
	$10^{-6}$	- 76	1	- 35
NAT 06-520	$10^{-4}$	nicht löslich in RPMI	100	toxisch
	$10^{-5}$	- 74	10	- 48
	$10^{-6}$	- 62	1	- 40

Tab. 2.10: Vergleich der Effekte von Flavonoiden auf die Synthese Plaque-bildender Zellen nach In-vitro-Immunisierung mit Schafererythrozyten (SRBC) und PWM-induzierter Lymphozytenproliferation in vitro.

Substanz	[mol/l]	Inhibition von PFC [%]	% Inhibition (-) oder Erhöhung(+) von PWM-induzierter Proliferation
Podoverin A	$1,1 \times 10^{-5}$	- 99,9	- 80
	$1,1 \times 10^{-6}$	- 35,0	0
	$1,1 \times 10^{-7}$	- 23,0	+ 10
Podoverin C	$10^{-4}$	- 100	- 50
	$10^{-5}$	- 65	+ 10
	$10^{-6}$	- 7	+ 10
Quercetin	$10^{-4}$	- 100	- 99
	$10^{-5}$	- 99	+ 6
	$10^{-6}$	- 35	+ 12

## **2.5 Interleukin-2-Freisetzung**

### **2.5.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Mit Concanavalin A stimulierte Milzzellen oder mononukleäre periphere Blutleukozyten sezernieren in das Kulturmedium Interleukin-2 (synonym mit "T cell growth factor"), das die Maus-T-Lymphozyten-Zelllinie (CTLL) zur Proliferation anregt. Das in die CTLL-Zellen eingebaute  $^3\text{H}$ -Thymidin ist ein Maß für die Zellproliferation.

Dieses Testsystem bietet sich u.a. zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Substanzen an, die einen inhibitorischen Effekt bei der Lymphozytenstimulation (Kap. 2.2) zeigten; es erlaubt die Auffindung von Substanzen, die entweder die Synthese und/oder die Sekretion von Interleukin-2 (IL-2) hemmen. Da IL-2 für die Aktivierung von Lymphozyten von zentraler Bedeutung ist, stellen Inhibitoren der IL-2-Freisetzung potentielle Therapeutika z.B. für Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßungsreaktionen dar.

### **2.5.2 Material und Methoden**

#### **2.5.2.1 Reagenzien**

##### **RPMI-Medium**

Trockenpulver RPMI-Medium (Flow 10-601-20) mit 50 ml Aqua bidest. anlösen und zusätzlich zugeben:

15 mmol/l Hepes-Puffer (Flow 15-884-13)  
100 I.E./ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin } (Flow 16-700-49)  
4 mmol/l Glutamin (Boehringer Mannheim 210-277)  
18 mmol/l  $\text{NaHCO}_3$  (Merck 6323)  
50 µmol/l 2-Mecaptoethanol (Merck 805740)  
mit Aqua bidest. auf 5 l auffüllen, bei -20 °C aufbewahren.

RPMI/10 % FKS (Flow 29-101, 1 h bei 56 °C hitzeinaktiviert).

[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT, Sigma M-2128)

$^3\text{H}$ -Thymidin (Amersham, TRK.296)

Ficoll-Paque (Pharmacia,  $\rho=1,077 \text{ g/ml}$ )

#### *2.5.2.2 Präparation der humanen peripheren Blutleukozyten (PBL)*

Die PBL werden aus dem heparinisierten (25 I.E./ml) Blut (20 ml) gesunder Spender gewonnen. Dazu wird das Blut auf 20 ml eines Ficoll-Paque-Gradienten geschichtet und 20 min bei  $750 \times g$  und Raumtemperatur zentrifugiert.

Die PBL in der Interphase werden gewonnen, mit 20 ml RPMI-Medium aufgenommen und 10 min bei  $250 \times g$  zentrifugiert. Nach nochmaligem Waschen wird das Sediment in 2 ml RPMI-Medium (10 % FKS) aufgenommen und die Lebendzellzahl in einer Thoma-kammer ermittelt (Vitalfärbung mit Acridinorange).

#### *2.5.2.3 Bioassay zum Nachweis von IL-2*

Zum Nachweis von IL-2 in Kulturüberständen von ConA-stimulierten mononukleären peripheren Blutleukozyten (PBL) bzw. Rattenmilzzellen werden  $5 \times 10^3$  CTLL-Zellen mit 100  $\mu\text{l}$  Kulturüberstand in einem Volumen von insgesamt 200  $\mu\text{l}$  in Mikrotiterplatten bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %iger  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre inkubiert. Nach 20 h werden 0,5  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin in 25  $\mu\text{l}$  RPMI-Medium zugesetzt und für weitere 4 h inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit einem Zellharvester (Skatron) auf Filterpapier (Flow) gesammelt. Die getrockneten Filter werden in Zinsser Minivials überführt und die  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaurate (dpm) nach Zugabe von 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Unisolve I, Fa. Zinsser) in einem Szintillationsspektrometer (LKB) bestimmt. Der IL-2-Gehalt wird durch serielle 1:2-Verdünnungen der Proben mittels Probit-plotting relativ zu einem definierten IL-2 Standard (Biotest) ermittelt.

#### *2.5.3 Ergebnisse und Diskussion*

Die Proliferation der CTLL-Zellen ist streng IL-2-abhängig (Abb. 2.6), ohne Zusatz dieses Interleukins sterben die Zellen innerhalb von 24 h ab.

Die Messung der Thymidin-Inkorporation in Abhängigkeit von der Verdünnung der Proben und anschließendes "Probit-plotting" erlaubt eine Quantifizierung des IL-2-Gehaltes von Kulturüberständen, wobei für die Kalkulation die  $\log_2$ -Verdünnung herangezogen wird, bei der man einen halbmaximalen Thymidin-Einbau beobachtet (Abb. 2.7).

Für die Quantifizierung der Proliferation der CTLL-Zellen, die ja ein Maß für die IL-2-Sekretion darstellt, wurde neben der Bestimmung der Einbaurate von  $^3\text{H}$ -Thymidin ein alternatives, in der Literatur beschriebenes Verfahren übernommen. Bei dieser Methode wird mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen aus dem schwach gelben Tetrazoliumsalz MTT das stark blau gefärbte Formazan gebildet, das photometrisch bestimmt werden kann und ein Maß für die Proliferationsrate darstellt (Tada et al., 1986). Wie in Abb. 2.8 dargestellt, verläuft die Farbreaktion im Bereich von  $3 \times 10^3 - 1 \times 10^5$  CTLL-Zellen linear.

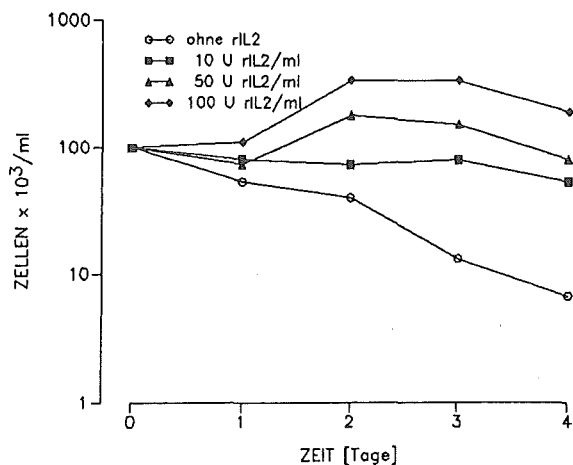
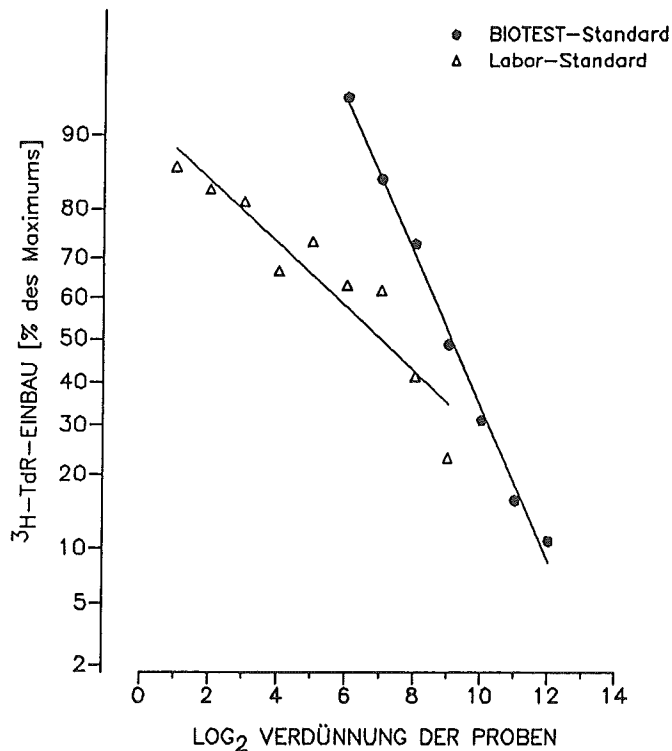
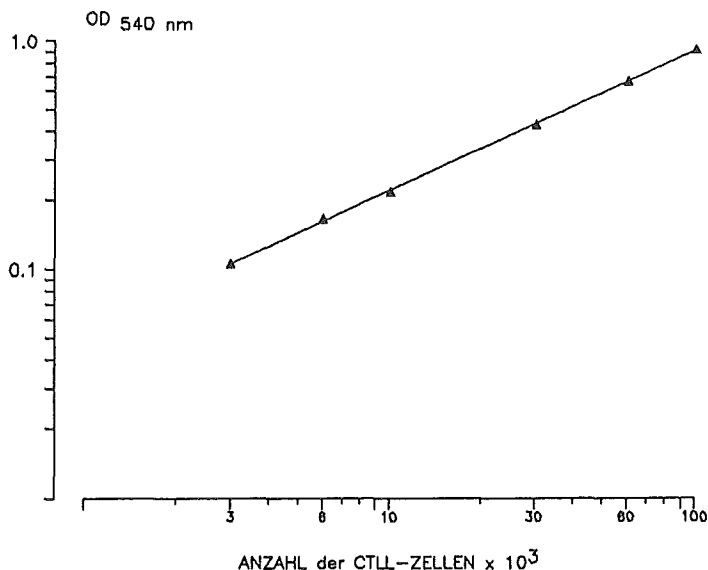


Abb. 2.6: Wachstum von CTLL-Zellen in Kultur nach Induktion durch rekombinantes IL-2.



**Abb. 2.7: Probit-Diagramm des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus in CTLL-Zellen.**  
 Die IL-2-Einheiten für den BIOTEST-Standard bzw. für den Labor-Standard wurden bestimmt, in dem die  $\log_2$ -Verdünnung für einen halbmaximalen Thymidin-Einbau berechnet wird.  
 BIOTEST-Standard:  $2^{9,25} \times 2 = 1218 \text{ U/ml}$   
 Labor-Standard:  $2^{6,95} \times 2 = 248 \text{ U/ml}$





**Abb. 2.8:** Linearität der MTT-Bestimmung. CTLL-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten aufgebracht. MTT (0,02 ml einer Stammlösung mit 5 mg/ml) wurde sofort allen Einzelkulturen zugesetzt und die Absorption aufgrund der Formazan-Bildung nach 4 h bei 37 °C gemessen.

Beide Verfahren, die Messung des <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbaus und die MTT-Reaktion, sind also geeignet, die Proliferation der CTLL-Zellen zu quantifizieren.

Im Gegensatz zu Rattenmilzzellen, die ex vivo nach Stimulation mit ConA deutliche Mengen Interleukin-2 bilden, stellte sich heraus, daß menschliche periphere mononukleäre Blutleukozyten (PBL) nach Stimulierung (5 µg ConA/ml) nur so geringe Mengen IL-2 produzieren, daß anhand dieser Zellen die Wirkung von Prüfsubstanzen auf die IL-2-Sekretion nicht nachgewiesen werden kann. Das Ziel, durch Verwendung menschlicher Zellen, die in relativ unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen, auf die Verwendung tierischen Materials verzichten zu können, konnte somit nicht erreicht werden.

Aus diesem Grund haben wir keine weiteren Versuche mehr unternommen, dieses Testmodell zu optimieren.

## **2.6 Chemilumineszenz von Makrophagen**

### **2.6.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Mit *Corynebacterium parvum* aktivierte Peritonealmakrophagen aus Maus und Meerschweinchen bilden nach Stimulierung mit opsonisiertem Zymosan (OpZ) oder mit dem Entzündungsmediator "Platelet Activating Factor" (PAF) infolge eines Anstiegs des oxidativen Stoffwechsels ("respiratory burst") u.a. auch Sauerstoffradikale, die in Gegenwart luminogener Verbindungen wie Luminol Licht erzeugen (Beschreibung der Methode in Lumac Systems A.G., Medical Applications, 1979). Die mit einem Luminometer quantifizierte Chemilumineszenz (CL) ist ein Maß für die Stimulierung der Makrophagen. In Gegenwart von Substanzen kann die Makrophagen-Aktivität unbeeinflusst, gesteigert oder vermindert sein.

Da die Chemilumineszenz eine relativ unspezifische Methode zur Messung von Produkten des sog. "respiratory burst" darstellt, bedarf sie der Ergänzung durch weitere Tests der Makrophagen-Aktivierung. Da Makrophagen bei Immunantwort und chronischen Entzündungen eine zentrale Rolle als Regulatoren zukommt, könnten die Hemmer der Makrophagen-Aktivität als Therapeutika bei chronischen Entzündungen und Immunerkrankungen eingesetzt werden.

### **2.6.2 Material und Methoden**

#### **2.6.2.1 Versuchstiere**

- a) Maus, CBA, männlich, 20-30 g schwer, Bomholtgard
- b) Meerschweinchen, PBW, männlich, 200-300 g schwer, Süddt. Versuchstierfarm

Die Tiere werden in Makrolon-Käfigen bei Standardfutter (Altromin, Lage) und Wasser ad libitum gehalten.

5-7 Tage vor dem Versuchstag wird den Tieren 0,2 ml (Maus) bzw. 1,5 ml (Meerschweinchen) *C. parvum* i.p. injiziert.

### 2.6.2.2 Puffer

#### a) PBS-Puffer (100 mmol/l, pH 7,4):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  (Merck; Art. 6580) 17,8 g/l

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  (Merck; Art. 6346) 13,8 g/l

durch Mischen folgender Stammlösungen auf pH 7,4 einstellen:

Für Gebrauch (10 mmol/l Phosphatpuffer):

100 ml 0,1 mol/l Phosphatpuffer

+ 8 g NaCl (Merck; Art. 6404)

+ 0,2 g KCl (Merck; Art. 4936)

-----  
ad 1000 ml A. dest. pH 7,4

#### b) BSS-Puffer

##### a) Stock I

Dextrose (Merck; Art. 8342) 10,00 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck; Art. 4873) 0,60 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  (Merck; Art. 6580) 2,38 g

-----  
A. dest. ad 1000 ml

##### b) Stock II

$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  (Merck; Art. 2381) 1,86 g

KCl (Merck; Art. 4436) 4,00 g

NaCl (Merck; Art. 6404) 80,00 g

$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  (Merck; Art. 5833) 2,22 g

$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  (Merck; Art. 5886) 2,00 g

-----  
A. dest. ad 1000 ml

bei 4 °C aufbewahren !

Für Gebrauch: 100 ml Stock I

100 ml Stock II

-----  
ad 1000 ml A. dest. pH 7,2 - 7,4

#### c) BSA-Puffer

2 % Bovine Serum Albumin (Sigma A7030) in BSS-Puffer

### 2.6.2.3 Reagenzien

#### a) Luminol

Luminol, Sigma No. A 8511

Ansatz 5,3 mg/100 ml BSS ( $3 \times 10^{-4}$  mol/l), zum Lösen über Nacht rühren lassen und im Dunkeln aufbewahren. Der Ansatz ist über 4 Wochen haltbar.

#### b) Oponisiertes Zymosan (OpZ)

Zymosan, Sigma Z-4250

Aus Kaninchenblut wird Serum gewonnen. Pro ml Serum werden 2 mg Zymosan zugegeben und bei 37 °C 30 min inkubiert. Das Zymosan wird bei 1000 x g 5 min abzentrifugiert und mit BSS-Puffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt.

#### c) "Platelet Activating Factor" (PAF)

NAT 04-216 (rac-C<sub>16</sub>-PAF); Molmasse 524 g/mol

Die Stammlösung wird in einer Konzentration von  $6 \times 10^{-3}$  mol/l in BSS-Puffer angesetzt (3,1 mg/ml). Es wird zu 10 µl portioniert und bei -20 °C eingefroren.

### 2.6.2.4 Gewinnung der Makrophagen

Die Makrophagen werden durch Auswaschen des Peritonealraums mit PBS-Puffer gewonnen. Nach Tötung der Tiere und Entfernung des Fells auf der Bauchseite wird den Mäusen 5 ml PBS-Puffer injiziert. Durch leichtes Massieren der Bauchdecke (ca. 1 min) verteilt sich der Puffer im Bauchraum und löst die Zellen ab. Die Zellsuspension wird mit einer Spritze dem Bauchraum entnommen und in ein 50-ml-Falconröhrchen überführt.

Den Meerschweinchen werden 50 ml Puffer injiziert, wobei die Zellsuspension bei geöffneter Bauchdecke entnommen wird.

Die Zellsuspension wird bei 300 x g 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und in 1 ml BSS-Puffer aufgenommen. Die Zellzahl wird jeweils im Coulter Counter bestimmt und mit BSS-Puffer auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

#### 2.6.2.5 Durchführung und Auswertung der Untersuchung

Zu 200  $\mu$ l Zellsuspension werden 200  $\mu$ l Substanzlösung (Konzentration von  $3 \times 10^{-4}$  -  $3 \times 10^{-7}$  mol/l) bzw. Puffer als Kontrolle gegeben. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l Luminol wird der Ansatz 10 min bei 37 °C im Luminometer inkubiert. Danach erfolgt der Zusatz des stimulierenden Agens (OpZ oder PAF).

In anfänglichen Studien mit OpZ wurde die Chemilumineszenz (CL) in relativen Lichteinheiten (RLU) in einem Lumac Bio-counter 2000 Luminometer 5 min nach Zusatz des Stimulus gemessen. In der Folgezeit wurde ein LKB 1251 Luminometer der (zur gleichzeitigen Bestimmung von 25 Proben) eingesetzt und die Chemilumineszenz in mV pro 5 min (für OpZ) oder 2 min (für PAF) nach Zusatz des Stimulus mit einem automatischen Dispenser gemessen. Für detaillierte Untersuchungen (z.B. die Bestimmung des  $pA_2$  für PAF-Antagonisten) wurde die Kinetik der CL-Produktion (in counts/min) in einem 6-Kanal-Berthold-Biolumat LB 9505 verfolgt, der mit einem Apple-IIe-Computer verbunden war, wobei für PAF 3 min und für OpZ 20 min gemessen wurde.

Alle Bestimmungen werden doppelt ausgeführt. Die Effekte der Inhibitoren werden als Prozentsatz der CL ausgedrückt, die in derselben Zellsuspension in Abwesenheit der Verbindung gemessen werden konnte.

Für detaillierte Untersuchungen des Einflusses von PAF-Rezeptor-Antagonisten wurden Dosis-Wirkungs-Kurven für rac- $C_{16}$ -PAF in Gegenwart und in Abwesenheit steigender Konzentrationen der einzelnen Antagonisten hergestellt, wobei Sorge getragen wurde, daß die komplette Dosis-Wirkungs-Kurve für den jeweiligen Antagonisten mit einer Zellsuspension gewonnen wurde, die aus einem einzigen Meerschweinchen stammte. Die Dosisabhängigkeit (dose ratio, DR) der Verschiebung in der Dosis-Wirkungs-Kurve für PAF in Gegenwart der Antagonisten wurde dadurch ermittelt, daß die gesamte Dosis-Wirkungs-Kurve gezeichnet wurde und der Abstand auf der Konzentrationsachse zwischen der Kontrollkurve und der in Gegenwart einer einzigen Konzentration des Antagonisten gemessen wurde, wobei diese Messung in Höhe des  $ED_{50}$ -Levels der Kurven erfolgte. Unter Verwendung der Gleichung:

$$pA_2 = - \log [B] + \log (DR-1)$$

mit [B] als der Konzentration des Antagonisten wurden  $pA_2$ -Werte für die Rezeptoraffinität der Antagonisten errechnet und Schild-Plots ( $\log (DR-1)$  gegen  $-\log [B]$ ) konstruiert (Arunlakshana and Schild (1959)). Steigungen und Linearität der Regressionsgeraden wurden mit Hilfe eines IBM-Computerprogramms (EPISTAT) bestimmt.

In weiteren Experimenten wurde der maximale Aktivierungszustand (MAS) der Zellsuspension von individuellen Tieren als die absolute CL (counts/min) bestimmt, die in Gegenwart von PAF am Maximum der Dosis-Wirkungs-Kurve in Abwesenheit von Antagonisten erzeugt wurde. Der MAS für die Zellsuspension wurde gegen die  $pA_2$ -Werte aufgetragen, die in Gegenwart des Antagonisten bestimmt worden waren (eine Konzentration des Antagonisten pro Suspension), und eine Regressionsanalyse für alle Plots, die für jeden Antagonisten erhalten worden waren, mit Hilfe des EPISTAT-Programms durchgeführt. Als PAF-Antagonisten wurden Kadsurenon, L652,731, BN52021, SRI63119 und Alprazolam verwendet. Diese waren freundlicherweise von T.Y. Shen, MSD, Rahway, USA; P. Braquet, IPSEN-Beaufort, Paris, Frankreich; C. Winslow, Sandoz, Hanover, USA und der Firma Upjohn zur Verfügung gestellt worden.

### *2.6.3 Ergebnisse und Diskussion*

C.-parvum-aktivierte Maus-Makrophagen erzeugen nach Stimulierung mehr Chemilumineszenz als residente Makrophagen, wobei die durch C. parvum hervorgerufene Steigerung des "respiratory burst" abhängig vom Zeitpunkt der Zellernte nach Aktivierung ist (Abb. 2.9).

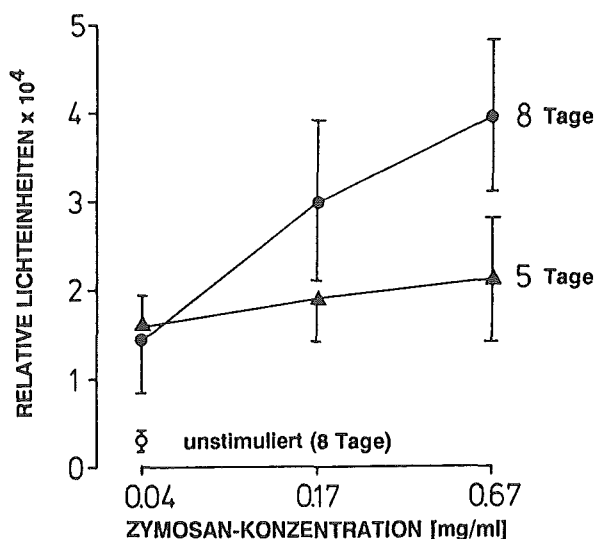


Abb. 2.9: Vergleich der Chemilumineszenz (CL) als Reaktion auf opsonisiertes Zymosan (gemessen als relative Licht-Einheiten) in Peritonealmakrophagen der Maus, die 5 bzw. 8 Tage nach In-vivo-Aktivierung mit i.p.-appliziertem *C. Parvum* gewonnen wurden. Die CL unstimulierter Zellen, die 8 Tage nach *C. parvum* gewonnen wurden, ist zum Vergleich mitangegeben. Die Einzelwerte sind Mittelwerte aus 3 Beobachtungen einschließlich Standardabweichung des Mittelwertes.

So reagierten acht Tage nach *C. parvum*-Aktivierung entnommene Zellen stärker auf opsonisiertes Zymosan als die nach fünf Tagen geernteten Zellen.

Die bekannte antiphlogistisch wirksame Substanz Indometacin steigerte bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l die Chemilumineszenz bei residenten Makrophagen (141 % des Kontrollwerts), während eine Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l ohne Wirkung war.

Dieser Befund konnte mit Ergebnissen eines Ex-vivo-Versuchs korreliert werden: Mäusen wurde fünf Tage vor der Zellernte *C. parvum* bzw. NaCl i.p. injiziert und verschiedene Dosen Indometacin bzw. Pimetacin (strukturelles Analogon zu Indometacin) zwei Tage vor der Zellernte verabreicht. Beide Entzündungshemmer führten zu einer Steigerung der Chemilumineszenz in residenten Makrophagen (Abb. 2.10).

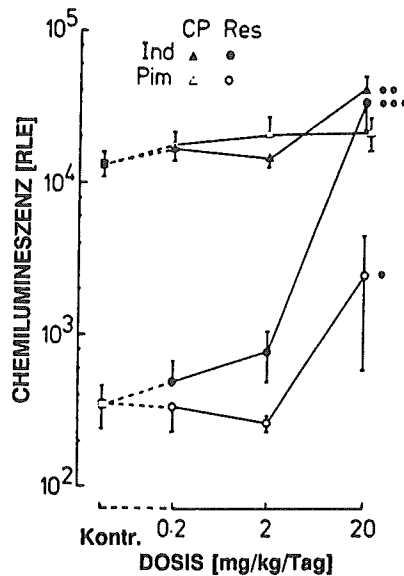


Abb. 2.10: Erhöhung der CL von nicht-aktivierten (Res) und *C.-parvum*-aktivierten (CP) Peritonealmakrophagen der Maus durch Indometacin (Ind) und dem analogen Thioester Pimetacin (Pim). Die Substanzen wurden in den angegebenen Dosierungen 2 Tage vor Isolierung der Zellen verabreicht.

Dieser Effekt kann am besten mit einer Hemmung der Cyclooxygenase und dem daraus resultierenden Wegfall der Feed-back-Inhibition durch Prostaglandin  $E_2$  erklärt werden. Wichtiger ist hier jedoch, daß zumindest für klassische nicht-steroidale Antiphlogistika aus dem Einfluß auf die Chemilumineszenz in vitro auf In- bzw. Ex-vivo-Aktivität geschlossen werden kann.

Im Gegensatz zu den Cyclooxygenase-Hemmern konnte, wie zu erwarten war, in Anwesenheit von Superoxid-Dismutase-Aktivität (SOD) eine konzentrationsabhängige Hemmung der Chemilumineszenz in vitro erzielt werden. Daher wurde diese enzymatische Aktivität später als Referenzsubstanz verwendet.

Weitere Untersuchungen zielten auf die Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Testergebnisse ab, da die Chemilumines-



zenzmessungen zunächst mit einer relativ großen Streuung behaftet waren. Eine Verringerung der Zellzahl unter  $10^6/\text{ml}$  senkte die Absolutwerte mehr als die Standardabweichungen (Tab. 2.11a), so daß mit kleineren Zellzahlen in der Folgezeit nicht mehr gearbeitet wurde. Bessere Ergebnisse konnten durch Zusatz von Rinderserumalbumin (BSA) erzielt werden, wobei 2 % BSA zwar die gemessene Lumineszenz, aber wesentlich deutlicher die Streuung der Meßwerte verringerte (Tab. 2.11b).

*Tab. 2.11: Abhängigkeit des Ausmaßes und der Variabilität der CL-Reaktion in C.-parvum-aktivierten Peritonealmakrophagen der Maus nach OpZ (0,17 mg/ml) von der Zell- bzw. der Serumalbumin-Konzentration.*

a) Zellkonzentration	Chemilumineszenz [mV]*
$1 \times 10^5$ Zellen/ml	$16,52 \pm 5,72$
$5 \times 10^5$ Zellen/ml	$40,85 \pm 24,91$
$1 \times 10^6$ Zellen/ml	$104,33 \pm 42,25$
b) Rinderserumalbumin-Konzentration	Chemilumineszenz [mV]*
0,5 %	$131,1 \pm 39,9$
1,0 %	$116,5 \pm 31,1$
2,0 %	$70,7 \pm 13,2$

Gegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung vom Mittelwert von 3 Bestimmungen mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ml.

\* Absolute CL-Werte vom LKB 1251 Luminometer

Die mit weiteren Referenzsubstanzen erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 2.12 zusammengestellt:

Tab. 2.12: Effekte verschiedener Inhibitoren auf die CL von *C.-parvum*-aktivierten Peritonealmakrophagen der Maus nach Stimulierung durch opsonisiertes Zymosan (OpZ) und den Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF). Die Angaben sind Mittelwerte von 3 Einzelbestimmungen, wobei die jeweils wirksamste Konzentration angegeben ist.

Substanz- klasse	Substanz	Konzentration [mol/l]	Inhibition der CL [%]	
			OpZ	PAF
Ca-Antagonist	Verapamil	10 <sup>-4</sup>	- 21	- 11
Calmodulin-Ant.	Trifluoperazin	10 <sup>-5</sup>	- 21	- 7
Ca <sup>2+</sup> -Chelator	EDTA	10 <sup>-6</sup>	+ 1	+ 1
OH'-Scavenger	Mannitol	10 <sup>-2</sup>	- 11	- 2
OH'-Scavenger	Na-benzoat	10 <sup>-3</sup>	- 52	- 7
NADPH-Oxidase- Inhibitor	Hydroxymercuri- benzoat	10 <sup>-3</sup>	- 98	- 70
Cyt. P <sub>450</sub> Inhibitor	Metirapon	10 <sup>-5</sup>	- 2	+ 4
Adenylatzyklase- Antagonist	SQ22536	10 µg/ml	- 4	- 20
Phosphodiesterase- Inhibitor	IBMX	10 <sup>-5</sup>	- 25	- 11
β-Adrenozeptor-Agon.	Isoprenalin	10 <sup>-6</sup>	- 44	- 26
Prostaglandin	PGE <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup>	- 16	- 41
Prostaglandin	ZK 36374	10 <sup>-6</sup>	+ 1	- 5
Phospholipase A <sub>2</sub> - Inhibitor	p-BPB	10 <sup>-4</sup>	- 98	- 94
Phospholipase A <sub>2</sub> - Inhibitor	Quinacrin	10 <sup>-4</sup>	- 23	- 31
Leukotrien-Antagon.	FPL 55712	10 <sup>-5</sup>	- 31	+ 3
Methylierungs- inhibitor	Homocystein + 3-deazaadenosin	10 <sup>-4</sup>	- 73	- 61

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die beiden verwendeten Stimuli OpZ und PAF ähnliche Wirkmechanismen haben, die enzymatische Methylierungsprozesse - wahrscheinlich die Überführung von Phosphatidylethanolamin in Phosphatidylcholin - und die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> und der NADPH-Oxidase miteinschließen. Die durch den Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX, durch Isoprenalin oder PGE<sub>2</sub> hervorgerufene Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration wirkt auf die durch beide Stimulatoren ausgelöste Chemilumineszenz hemmend, während das Hydroxyl-Radikal eine bedeutendere Rolle in der

OpZ-induzierten als in der PAF-induzierten Chemilumineszenz spielt. Die Daten zeigen, daß die Chemilumineszenz der Makrophagen durch verschiedenartige Substanzen und Mechanismen beeinflussbar ist.

Um zu belegen, daß die in vitro erzielten Ergebnisse auch unter In-vivo-Bedingungen Relevanz besitzen, wurden einige in vitro wirksame Substanzen in In-vivo-Entzündungsmodellen wie dem "CVF-Ödem" und dem "Granulom" geprüft.

Beim CVF-Pfotenödem wird durch Injektion von CVF ("cobra venom factor") in die Rattenpfote eine Entzündung über die Aktivierung des Komplement-Systems ausgelöst. Einige der bei dieser Reaktion aktivierten Komplement-Faktoren (z.B. C5a) stimulieren besonders in Leukozyten die Bildung anderer Entzündungs-Mediatoren, zu denen auch Sauerstoffradikale gehören. Tabelle 2.13 zeigt, daß ein großer Teil der Substanzen, die in vitro eine Hemmwirkung auf die Makrophagen-Chemilumineszenz besitzen, auch in vivo wirksam sind und die durch CVF ausgelöste Pfotenschwellung vermindern. Die schwache oder Nichtwirksamkeit einiger der geprüften Verbindungen im CVF-Ödem könnte in der schlechten Resorption nach oraler Gabe begründet sein oder andere pharmakokinetische Ursachen (z.B. schnelle Metabolisierung) haben. Die meisten der in Tab. 2.13 gezeigten Verbindungen sind Antioxidantien, Radikal-Fänger und/oder Inhibitoren des Arachidonsäure-Metabolismus. Diese Befunde deuten darauf hin, daß das CVF-Pfotenödem ein geeignetes In-vivo-Modell für Substanzen darstellt, die sich in der "Makrophagen-Chemilumineszenz" als wirksam erwiesen haben.

Im weiteren Verlauf des Projektes wurden insgesamt 495 Substanzen auf Hemmung der durch opsonisiertes Zymosan stimulierten Makrophagen-Chemilumineszenz geprüft; weitere 37 wurden diesem Test nach Anregung der CL durch PAF unterzogen. Die meisten der geprüften Verbindungen stammten aus zwei Substanzklassen, den Organo-Selen-Verbindungen und derivatisierten langkettigen Fettsäuren.

Zum Vergleich der In-vitro- und In-vivo-Wirksamkeit wurde ein Teil der Verbindungen einer Prüfung im CVF-Pfotenödem unterzogen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2.14 und 2.15 niedergelegt.

*Tab. 2.13: Vergleich der Hemmwirkung von Substanzen auf die Chemilumineszenz von aktivierten Peritonealmakrophagen der Maus nach Stimulation durch opsonisiertes Zymosan (0,17 mg/ml) mit den Effekten im CVF-induzierten Pfotenödem. Die Ergebnisse im CVF-induzierten Ödem sind Mittelwerte von 10 Einzelbeobachtungen.*

Substanz	Chemilumineszenz		CVF-Ödem		
	Konz. [mol/l]	% Änderung	Dosis [mg/kg]	Route	% Änderung
Superoxid-Dismutase	6 U/ml	- 59	10	s.c.	+ 24
Phenidon	$2,57 \times 10^{-5}$	- 74	10	i.v.	- 73
BW 755C	$10^{-5}$	- 55	10	i.v.	- 43
Rosmarinsäure	$5 \times 10^{-5}$	- 60	0,316	i.v.	- 45
Ebselen	$1,8 \times 10^{-5}$	- 99 <sup>a</sup>	31,6	p.o.	-54/-41 <sup>b</sup>
NAT 01-497	$10^{-5}$	- 51	100	p.o.	+ 43 <sup>c</sup>
NAT 01-499	$10^{-5}$	- 46	100	p.o.	- 62
NAT 01-501	$10^{-5}$	- 46	100	p.o.	- 77
NAT 07-170	$10^{-5}$	- 55	100	p.o.	- 57
NAT 07-186	$10^{-5}$	- 52	31,6	p.o.	- 20
NAT 07-194	$10^{-5}$	- 50	31,6	p.o.	- 21
NAT 07-210	$10^{-5}$	- 85	100	p.o.	+ 14
NAT 36-001	$10^{-5}$	- 58	100	p.o.	- 29

<sup>a</sup> residente Mausperitonealmakrophagen

<sup>b</sup> Doppelbestimmungen

<sup>c</sup> auch i.m. inaktiv

*Tab. 2.14: Vergleich der Hemmwirkung von Organoselen-Verbindungen auf das CVF-induzierte Rattenpfotenödem und auf die Chemilumineszenz von Peritonealmakrophagen der Maus nach Stimulierung durch opsonisiertes Zymosan. Die Effekte auf das CVF-induzierte Ödem sind aus 10 Beobachtungen und diejenigen auf die Chemilumineszenz aus 3 Beobachtungen ermittelt.*

Substanz	Chemilumineszenz (% Inhibition bei 10 µmol/l)	CVF-Ödem (% Inhibition bei 100 mg/kg i.v.)
NAT 02-661	10	45
NAT 02-675	24	60
NAT 02-677	16	70
NAT 02-685	(+14)	4
NAT 02-687	28	4
NAT 02-703	11	(+9)
NAT 02-717	11	50
NAT 02-719	(+8)	10
NAT 02-720	20	41
NAT 02-721	86	9
Ebselen	6	65
NAT 06-085	41	5*
NAT 06-086	49	34*
NAT 06-628	7	65

\* % Inhibition bei 31,6 mg/kg p.o.

*Tab. 2.15: Vergleich der Hemmwirkung von langkettigen Fettsäure-Analoga auf das CVF-induzierte Rattenpfotenödem und auf die Chemilumineszenz von Peritonealmakrophagen der Maus nach Stimulierung durch opsonisiertes Zymosan. Die Effekte auf das CVF-induzierte Ödem sind aus 10 Beobachtungen und diejenigen auf die Chemilumineszenz aus 3 Beobachtungen ermittelt.*

Substanz	Chemilumineszenz (% Inhibition bei 10 µmol/l)	CVF-Ödem (% Inhibition bei 100 mg/kg i.v.)
NAT 04-159	- 42	69
NAT 04-433	+ 7	69
NAT 04-439	+ 4	35
NAT 04-440	+ 3	42
NAT 04-444	+ 5	33
NAT 04-448	+ 3	50
NAT 04-450	+ 6	26

Bei beiden genannten Substanzklassen läßt sich zunächst keine Korrelation zwischen den Wirkungen der Verbindungen in der Makrophagen-Chemilumineszenz und im CVF-Pfotenöden erkennen. Dafür lassen sich zwei Gründe anführen:

- 1) Es ist für eine antiphlogistische Wirksamkeit nicht essentiell, daß auch die in Makrophagen durch Stimulation ausgelöste Chemilumineszenz inhibiert wird. Für die Substanzen, die trotz fehlender oder nur geringer Wirksamkeit in vitro in dem In-vivo-Modell gute Wirksamkeit zeigten, muß man einen anderen Mechanismus der Wirkung annehmen.
- 2) Pharmakokinetische Untersuchungen einiger Vertreter beider geprüfter Substanzklassen zeigten, daß Verbindungen aus der Gruppe der Benzisoxaselenazolone und der Fettsäure-Derivate einem ausgeprägten "First-pass-effect" unterliegen, also nach oraler Applikation sehr schnell metabolisiert werden und somit den Wirkort nicht erreichen. So ist es zu erklären, daß einige Verbindungen trotz hervorragender inhibitorischer Potenz in vitro das durch CVF ausgelöste Pfotenödem nicht vermindern konnten.

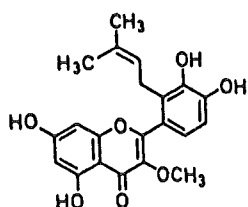
Diese Ergebnisse ließen den Schluß zu, daß trotz teilweise guter Korrelation bei Verbindungen anderer Substanzklassen das CVF-Ödem möglicherweise nicht der richtige "In-vivo-Partner" für das "In-vitro-Modell" der Makrophagen-Chemilumineszenz darstellte. Daher wurden zum Zwecke einer besseren Korrelierung der in vitro mit den in vivo erzielten Ergebnissen zwei weitere In-vivo-Modelle herangezogen, bei denen die Makrophagen-Funktion eine große Rolle spielt:

Beim "Cotton-Pellet-Granulom" wird bei der Ratte die Entzündung durch einen mit Cotton-Öl oder Carragenin-getränkten und unter die Rückenhaut gepflanzten Wattebausch ausgelöst, beim "Deckgläschen-Granulom" wird unter die Rückenhaut der Ratte ein Kunststoffgläschen gepflanzt, das eine unspezifische entzündliche Reaktion auslöst und nach einigen Tagen von einer Zellschicht - besonders Makrophagen - bedeckt ist. Das Ausmaß der entzündlichen Reaktion läßt sich z.B. durch planimetrische Auswertung oder auch durch Quantifizierung zelltypischer Reaktionen dieser Granulom-Zellen bestimmen.

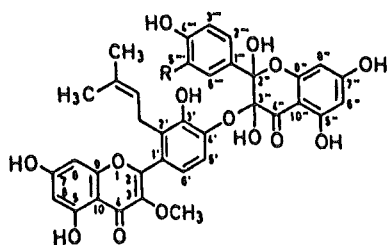
So wurden einige der Inhibitoren der Makrophagen-Chemilumineszenz auf ihre Wirksamkeit im "Cotton-Pellet-Granulom" nach oraler Applikation geprüft. Keine der Substanzen bewirkte signifikante Veränderungen in der Granulom-Bildung. Eine Erklärung für diese fehlende Wirksamkeit könnte darin liegen, daß die Substanzen eher als Inhibitoren der Sekretion von Makrophagen-Oxidationsprodukten wirken als generell die Makrophagen-Funktion zu inhibieren. Aufgrund dieser Negativ-Befunde wurden keine weiteren Untersuchungen mehr in diesem Modell durchgeführt.

Einige Experimente wurden auch mit dem "Deckgläschen-Granulom" gemacht. Dabei wurden als Referenzsubstanzen Ebselen (100 mg/kg p.o.), Indometacin (3 mg/kg p.o.) und Dexamethason (2 mg/kg p.o.) eingesetzt. Mit allen geprüften Substanzen konnten keine klaren inhibitorischen Effekte nachgewiesen werden. Angesichts der Tatsache, daß an dieser Form von Entzündung eine gemischte Zellpopulation (Granulozyten, Makrophagen, Fibroblasten) beteiligt ist und damit Untersuchungen des Einflusses von Prüfsubstanzen auf die Funktion von Makrophagen allein schwierig sind, und abzusehen war, daß eine Optimierung dieses Modells größere Mengen an Versuchstieren für die Standardisierung und Charakterisierung notwendig machte, wurde auf weitere Untersuchungen verzichtet.

Während des routinemäßigen Screenings von Extrakten aus Pflanzenzellkulturen auf Hemmung der Zymosan-induzierten Makrophagen-Chemilumineszenz - diese Untersuchungen wurden in Verbindung mit dem Forschungsvorhaben "Pflanzenzellkulturen (PZK) zur Auffindung neuer therapeutisch relevanter Naturstoffe und der Gewinnung durch Fermentationsprozesse" (Förderungskennzeichen: 03-8654-0) durchgeführt - fiel auf, daß ein Extrakt aus der Podophyllum-versipelle-Zellkultur große inhibitorische Aktivität aufwies. Nach Anreicherung und Reinigung konnten drei neue Flavonoide gefunden werden, die Podoverine A, B und C (Abb. 2.11), die alle die Makrophagen-Chemilumineszenz in einer ähnlichen Konzentration wie das Flavonoid Quercetin und das ebenfalls aus Pflanzen stammende Antioxidativum Nordihydroguaiaretsäure (NDGA) (Arens et. al., 1986; Abb. 2.12) inhibierten.



Podoverin A



R = OH, Podoverin B

R = H, Podoverin C

Abb. 2.11: Strukturen von Podoverin A, B und C.

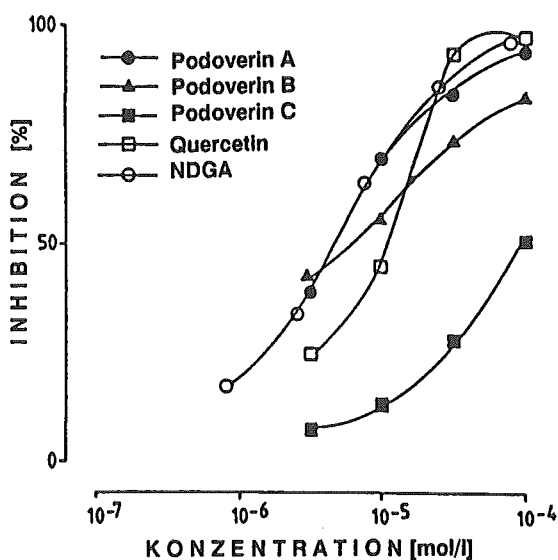


Abb. 2.12: Dosis-Wirkungs-Kurve für die Hemmung der CL der Makrophagen durch Podoverin A, B und C und die Referenz-Verbindungen NDGA und Quercetin. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3-4 Einzelbestimmungen.



Da Podoverin C in einer relativ größeren Menge in der genannten Zellkultur enthalten war, wurde es weiterführenden Untersuchungen in vitro und in vivo unterzogen, obwohl es sich als weniger potent als die anderen beiden erwies. Dabei zeigte Podoverin C nicht nur eine gute Wirksamkeit in verschiedenen anderen In-vitro-Prüfmodellen, die in diesem Abschlußbericht beschrieben sind, sondern auch im CVF-induzierten Pfotenödem in vivo (Tab. 2.16). Diese Daten belegen, daß nicht nur die Makrophagen-Chemilumineszenz ein nützliches In-vitro-Modell für das Screening auf antiinflammatorisch wirksame Substanzen ist, sondern daß sich einige In-vitro-Modelle aus dem Bereich Entzündung/Immunologie in ihren Mechanismen bzw. in ihren Aussagemöglichkeiten überschneiden, so daß bei Verwendung mehrerer dieser In-vitro-Methoden Substanzen gefunden werden können, die einen breiten Bereich antiinflammatorischer und immunregulatorischer Aktivitäten in vivo abdecken.

*Tab. 2.16: Vergleich der Hemmeffekte von Podoverin C in einer Reihe von In-vitro-Tests und auf das CVF-induzierte Rattenpfotenödem in vivo.*

Versuch	IC <sub>50</sub> [µmol/l]	% Inhibition	
		bei 1 mg/kg i.v.	p.o.
Makrophagen CL	95		
Makrophagen-Phagozytose	80		
Lymphozytenproliferation			
ConA	ca. 4		
LAG	ca. 6		
PWM	ca. 10		
5-Lipoxygenase	9.5		
12-Lipoxygenase	100		
Cyclooxygenase	22		
CVF-Pfotenödem	-	53	44

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Rau, Universitätsklinik Köln-Merheim, wurde die Chemilumineszenz der Blutmonozyten von Patienten mit Karzinomen im Vergleich zu den von gesunden Probanden untersucht und dabei Unterschiede festgestellt. Bei

diesen Experimenten stellte sich jedoch heraus, daß man relativ große Mengen an Blut benötigte, so daß die Absicht verworfen wurde, Humanmonozyten anstelle von Tiermakrophagen für das Screening einzusetzen.

Eine weitere Alternative war die Verwendung permanenter Makrophagen-ähnlicher bzw. monozytärer Zelllinien. Die Untersuchungen mit diesen Zelllinien (u.a. P388D<sub>1</sub>, U937) hatten jedoch als Ergebnis, daß in Abhängigkeit vom Stimulus entweder gar keine oder nur eine schwache Chemilumineszenz gemessen werden konnte. Damit war klar, daß auch weiterhin auf frisch isolierte Makrophagen zurückgegriffen werden mußte.

Voruntersuchungen hatten gezeigt, daß die durch PAF induzierte Makrophagen-Chemilumineszenz ein geeignetes Modell für die Auffindung von PAF-Rezeptorantagonisten war. Neben dem bekannten PAF-Antagonisten Kadsurenon erwies sich auch eine Verbindung aus der Nattermann-Forschung (NAT 05-333; Abb. 2.13) als kompetitiver Inhibitor der durch PAF induzierten Chemilumineszenz. NAT 05-333 zeigte auch in vivo gute Wirksamkeit, so z.B. in der Plasma-Exsudation, die in der Rattenhaut durch die intrakutane Gabe von PAF induziert wurde (Meßparameter: Extravasation von Evansblau-Farbstoff) und in dem Modell "Blutdruck-Ratte", in dem die durch intravenöse Applikation von PAF ausgelöste Blutdrucksenkung antagonisiert werden konnte. Anhand dieses Beispiels läßt sich zeigen, daß über das Screening in der "PAF-induzierten Makrophagen-Chemilumineszenz" auch in vivo wirksame PAF-Antagonisten gefunden werden können.

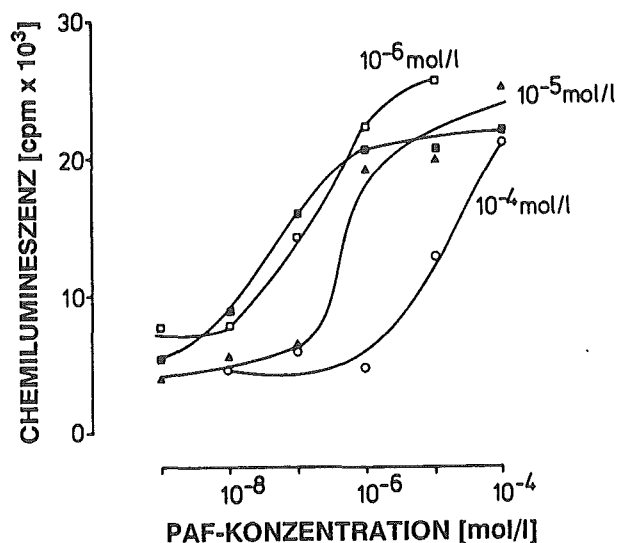


Abb. 2.13: Kompetitiver Antagonismus der PAF-induzierten Chemilumineszenz in Peritonealmakrophagen der Maus nach Vorinkubation mit der Substanz NAT 05-333 im für 10 min Berthold-Biolumat. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 9-12 Kontrollexperimenten und 2-4 Experimenten in Gegenwart der Testsubstanz.

Bei einem Vergleich der Hemmwirkung des PAF-Rezeptor-Antagonisten Kadsurenon auf die PAF-induzierte (Meerschweinchen)-Makrophagen-Chemilumineszenz und auf die PAF-induzierte (Schwein-)Neutrophilen-Aggregation wurde aus den  $pA_2$ -Werten deutlich, daß die Affinität des Antagonisten zu den PAF-Rezeptoren der Makrophagen ungefähr 100mal so groß ist wie zu den PAF-Rezeptoren der Leukozyten (Abb. 2.14). Damit stellte sich die Frage, inwieweit der Aktivierungszustand der Makrophagen die Affinität von PAF-Antagonisten zu den PAF-Rezeptoren und damit die Hemmung der durch PAF ausgelösten Chemilumineszenz beeinflusst. Zur Beantwortung dieser Frage wurden in zahlreichen Versuchsansätzen Peritonealmakrophagen von Meerschweinchen mit *C. parvum* aktiviert und die durch PAF ausgelöste Chemilumineszenz in Abwesenheit und in Anwesenheit verschiedener PAF-Antagonisten gemessen. Dabei deuten erhöhte Chemilumineszenz-Werte in den Kontrolluntersuchungen auf eine erhöhte Aktivität der Makrophagen hin.

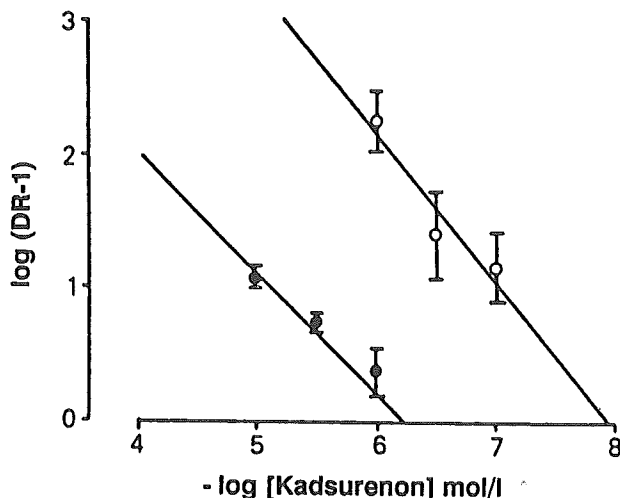


Abb. 2.14: Schild-Plots, die nach der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt wurden, für den Antagonismus von Kadsurenon auf die PAF ( $10^{-10}$  -  $10^{-4}$  mol/l)-induzierte Chemilumineszenz (CL) in aktivierten Peritonealmakrophagen (O) und die PAF-induzierte Aggregation von Schweineleukozyten aus Blut (●). Jeder Wert ist das Mittel aus 3-5 (bei der CL) und 5 (bei der Aggregation) Einzeluntersuchungen; die Standardabweichung vom Mittelwert wird durch die Senkrechten repräsentiert. Ordinate:  $\log (DR-1)$ , wobei DR der Dosis-Wirkungs-Kurve von Kadsurenon entspricht. Abzisse: negativer Logarithmus der molaren Konzentration von Kadsurenon. Die Steigungen beider Regressionsgeraden unterscheiden sich nicht signifikant von -1. Die Schnittpunkte auf der Abzisse sind die  $pA_2$ -Werte.

Ermittelt man aus den Dosis-Wirkungs-Kurven die  $pA_2$ -Werte und korreliert diese mit den absoluten Chemilumineszenz-Werten in cpm, so findet man z.B. für Kadsurenon eine Abhängigkeit des  $pA_2$ -Wertes von der maximalen Chemilumineszenz, d.h. vom Aktivierungszustand der Makrophagen, während die Affinität von BN52021 zum PAF-Rezeptor unabhängig vom Aktivierungszustand des Makrophagen zu sein scheint. Die Abbildungen 2.15A und B zeigen die Dosis-Wirkungs-Kurven für Kadsurenon und BN52021, die Abbildungen 2.16A und B die Abhängigkeit der  $pA_2$ -Werte von der maximalen Chemilumineszenz.

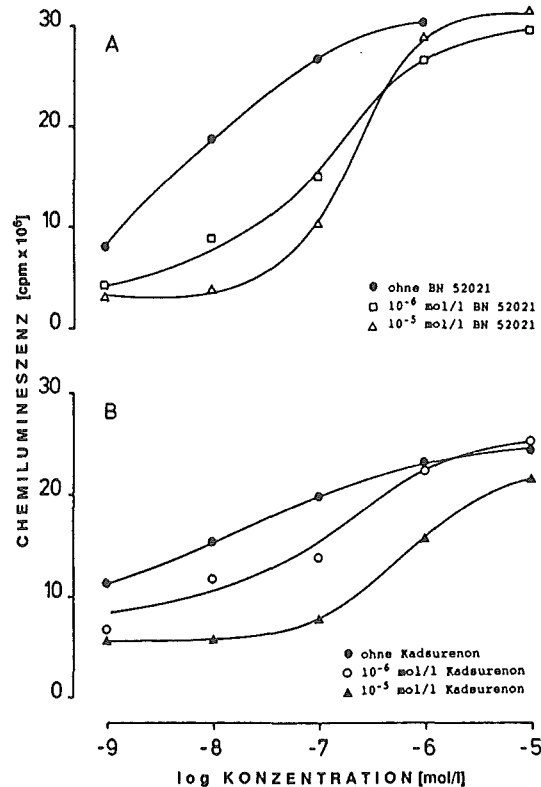


Abb. 2.15: Dosis-Wirkungs-Kurven der PAF-Antagonisten BN 52021 (A) und Kadsurenon (B) für die PAF-induzierte Chemilumineszenz.

Tabelle 2.17 stellt die für die verschiedenen PAF-Antagonisten erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte dar.

Schild-Plots für die verschiedenen Antagonisten (Abb. 2.17) ergaben, daß nur für BN 52021 und Kadsurenon nahezu eine Gerade erhalten wurde. Für die übrigen PAF-Rezeptor-Antagonisten L652731, SRI 63119 und Alprazolam war es nicht möglich, eine Abhängigkeit der Affinität zu den PAF-Rezeptoren der Makrophagen von dem Aktivierungszustand der Zellen aufzuzeigen. Damit wurde deutlich, daß die PAF-induzierte Makrophagen-Chemilumineszenz nicht generell geeignet ist, zwischen den Charakteristika verschiedener PAF-Rezeptor-Antagonisten zu unterscheiden, da nur zwei kompetitive Antagonisten, nämlich Kadsurenon und BN 52021, auf diese Weise analysiert werden konnten.

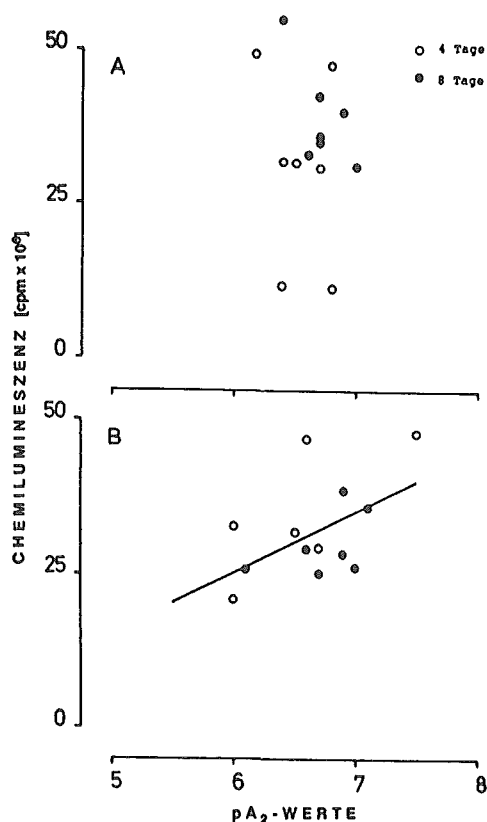


Abb. 2.16: Korrelation zwischen der  $pA_2$ -Werten für die PAF-Antagonisten BN 52021 (a) bzw. Kadsurenon (B) einerseits und der maximalen Chemilumineszenz-Bildung in Mausperitonealmakrophagen in Abwesenheit der Antagonisten andererseits. Die Makrophagen wurden 4 bzw. 8 Tage vor Verwendung mit *C. parvum* aktiviert.

Neben den näher charakterisierten Referenzverbindungen konnten im Screening weitere Verbindungen mit PAF-antagonistischen Eigenschaften gefunden werden, so z.B. aus Ginkgo biloba-Extrakten, die teilweise noch näher charakterisiert werden müssen.

Das Modell der PAF-induzierten Makrophagen-Chemilumineszenz bietet den Vorteil, daß mit den Zellen, die aus einem einzigen Meerschweinchen gewonnen werden, etwa 20 bis 25 Untersuchungen durchgeführt werden können. Damit ist der Tierversbrauch auf ein Mindestmaß reduziert. Sollte eine Chemilumineszenz-bildende permanente Makrophagen-Zelllinie gefunden

werden, so könnte der Tierverbrauch auf Null reduziert werden. Diesbezügliche Bemühungen werden fortgesetzt.

*Tab. 2.17: Hemmstärken verschiedener PAF-Rezeptor-Antagonisten auf die PAF-induzierte CL in aktivierten Peritonealmakrophagen aus Meerschweinchen. Die Angaben stellen Mittelwerte aus mehreren Versuchen dar, deren Anzahl in Klammern angegeben sind.*

Substanz	IC <sub>50</sub> [µmol/l]	Relative Wirkstärke
Alprazolam	161,00 (21)	383,3
BN52012	6,08 (23)	14,3
L652731	0,42 (24)	1,0
Kadsurenon	5,25 (16)	12,3
SRI63119	311,00 (17)	731,0

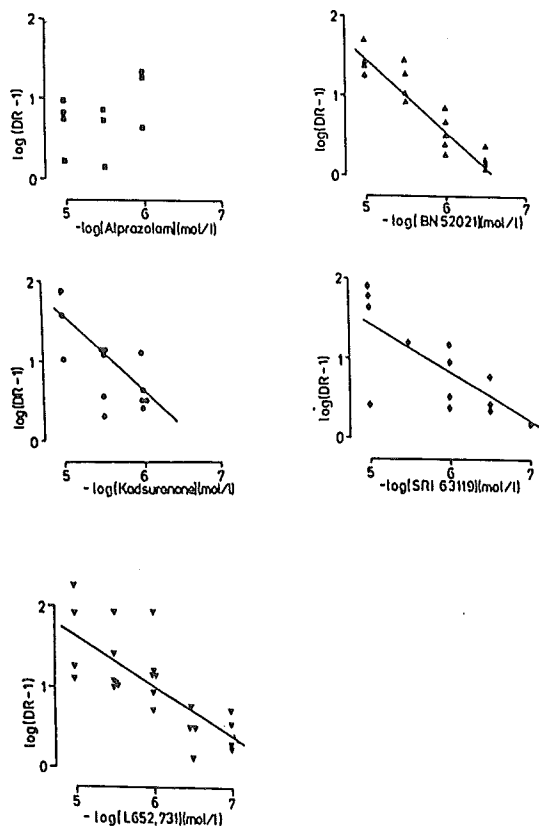


Abb. 2.17: Schild-Plots des Antagonismus der PAF-induzierten CL-Bildung aus aktivierten Peritonealmakrophagen von Meerschweinchen durch verschiedene PAF-Rezeptor-Antagonisten.



## **2.7 $H_2O_2$ -Freisetzung durch aktivierte Makrophagen**

### **2.7.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

*Corynebacterium-parvum* aktivierte Peritonealmakrophagen von Meerschweinchen setzen nach Stimulierung mit opsonisiertem Zymosan (OpZ) Wasserstoffperoxid frei, dessen Konzentration in Gegenwart von Phenolrot und Meerrettich-Peroxidase photometrisch bestimmt werden kann (Methode nach Pick und Keisari, 1980). In Gegenwart von Substanzen kann die  $H_2O_2$ -Produktion unbeeinflusst, vermindert oder gesteigert sein. Die Wirkung von Prüfsubstanzen wird in prozentual verringerter oder gesteigerter  $H_2O_2$ -Freisetzung ausgedrückt.

Die  $H_2O_2$ -Produktion durch aktivierte Makrophagen ist ebenso wie die durch Radikalbildung hervorgerufene Chemilumineszenz ein Maß für die Stimulation der Makrophagen. Hemmer der Makrophagenaktivierung könnten über eine Abschwächung der Immunantwort therapeutisch wirksam sein.

### **2.7.2 Material und Methoden**

#### **2.7.2.1 Versuchstiere**

Meerschweinchen, männlich, 200-300 g, Süddt. Versuchstierfarm werden in Makrolon-Käfigen bei Standardfutter (Altromin, Lage) und Wasser ad libitum gehalten.

Raumtemperatur:  $20 \pm 2$  °C

Hell-Dunkel-Rhythmus: 12 h

Luftwechsel: 16fach/h

7 Tage vor dem Versuchstag wird den Tieren jeweils 1,5 ml *C. parvum* i.p. injiziert.

#### **2.7.2.2 Puffer**

a) PBS-Puffer (10 mmol/l, pH 7,4):

$Na_2HPO_4 \cdot x 2 H_2O$  (Merck; Art. 6580) 17,8 g/l

$NaH_2PO_4 \cdot x 2 H_2O$  (Merck; Art. 6346) 13,8 g/l

durch Mischen folgender Stammlösungen auf pH 7,4 einstellen:

Für Gebrauch (10 mmol/l Phosphatpuffer):

100 ml 0,1 mol/l Na-Phosphatpuffer  
+ 8 g NaCl (Merck; Art. 6404)  
+ 0,2 g KCl (Merck; Art. 4936)

-----  
ad 1000 ml A. dest. pH 7,4

b) BSS-Puffer

a) Stock I

Dextrose	(Merck; Art. 8342)	10,00 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Merck; Art. 4873)	0,60 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	(Merck; Art. 6580)	2,38 g

-----  
A. dest. ad 1000 ml

b) Stock II

CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	(Merck; Art. 2381)	1,86 g
KCl	(Merck; Art. 4436)	4,00 g
NaCl	(Merck; Art. 6404)	80,00 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	(Merck; Art. 5833)	2,22 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	(Merck; Art. 5886)	2,00 g

-----  
A. dest. ad 1000 ml

bei 4 °C aufbewahren !

Für Gebrauch: 100 ml Stock I  
100 ml Stock II

-----  
ad 1000 ml A.dest. pH 7,2 - 7,4

c) Kaliumphosphatpuffer pH 7,0

a) 0,01 mol/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck 4873) 0,136 g/100 ml Aqua  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck 5099) 0,174 g/100 ml Aqua

b) 0,05 mol/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck 4873) 0,68 g/100 ml Aqua  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck 5099) 0,87 g/100 ml Aqua

d) PRS-Lösung

Zu 50 ml Kaliumphosphatpuffer 0,01 mol/l pH 7,0 gibt man:  
0,818 g NaCl (Merck 6404)  
0,108 g D-Glucose (Merck 8342)  
0,005 g Peroxidase (Horseradish Typ III, Sigma)  
in 1 ml 0,05 mol/l Kaliumphosphatpuffer gelöst)  
1 ml Phenolrot 1 % (Merck)

**2.7.2.3 Reagenzien**

a) Opsonisiertes Zymosan (OpZ)

Zymosan, Sigma Z-4250

Aus Kaninchenblut wird Serum gewonnen. Pro ml Serum werden 2 mg Zymosan zugegeben und bei 37 °C 30 min inkubiert. Das Zymosan wird bei 1000 x g 5 min abzentrifugiert und mit BSS-Puffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt.

b) *Corynebacterium parvum*

7 mg/ml Thiomersol-konserviert (Deutsche Wellcome, Burgwedel, batch no. CA 761)

c) Penicillin/Streptomycin (Flow)

5000 U/l; 5000 µg/ml

**2.7.2.4 Gewinnung der Makrophagen**

Die Makrophagen werden durch Auswaschen des Peritonealraums der Meerschweinchen mit PBS-Puffer gewonnen. Nach Tötung der Tiere werden ihnen 50 ml Puffer in die Bauchhöhle injiziert. Durch leichtes Massieren der Bauchdecke (ca. 1 min) verteilt sich der Puffer im Bauchraum und löst die Zellen ab. Die Zellsuspension wird mit einer Spritze dem Bauchraum entnommen, in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt und bei 300 x g 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1 ml PBS aufgenommen und resuspendiert. Für die Hämolyse der meist vorhandenen Erythrozyten werden nun 3,75 ml Wasser (Ampuwa) zugegeben und nach einer Einwirkzeit von ca. 10 sec mit PBS auf 30 ml aufgefüllt. Nach weiterem Zentrifugieren bei 300 x g für 10 min bei Raumtemperatur werden die Zellen in 1 ml BSS resuspendiert, in Coulter Counter gezählt und durch Verdünnen mit Medium 199 (50 ml Medium 199 + 50 ml ste-

riles Aqua bidest. + 2 ml Penicillin/Streptomycin) auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

#### *2.7.2.5 Durchführung der Untersuchung*

Die Zellen werden in 1-ml-Portionen in 24-well-Zellkulturschalen (Nunc, Wiesbaden) verteilt und im Brutschrank bei 37 °C mindestens 2 h inkubiert, damit die Makrophagen anwachsen. Danach werden die Überstände abgenommen und 1 ml frisches Medium der folgenden Zusammensetzung zugegeben:

500 µl Prüfsubstanz in PRS (die Substanz-Konzentration beträgt in der Regel  $2 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-6}$  und  $2 \times 10^{-7}$  mol/l)  
500 µl Zymosan (0,5 mg/ml Endkonz.)

Das Medium wird vorher 10 min bei 37 °C vorinkubiert.

Nach zwei Stunden Inkubation bei 37 °C unter 5 % CO<sub>2</sub> wird der jeweilige Überstand einer photometrischen Messung bei 610 nm unterzogen. Dazu werden 500 µl Überstand mit 400 µl 0,02 mol/l NaOH verdünnt. Gemessen wird gegen 500 µl PRS/BSS (1:1) + 400 µl 0,02 mol/l NaOH.

Die ermittelten Extinktionen werden mit Hilfe einer Standardkurve in nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/2 x 10<sup>6</sup> Zellen umgerechnet. Die Hemmung der stimulierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Freisetzung wird prozentual zur Kontrolle (= 100 %) ausgedrückt.

#### *2.7.3 Ergebnisse und Diskussion*

Tabelle 2.18 zeigt den Effekt von verschiedenen Antirheumatika und Immunmodulatoren auf die Zymosan-induzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Freisetzung aus aktivierten Meerschweinchen-Makrophagen.

Indometacin und Levamisol zeigen eine dosisabhängige Hemmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung, d-Penicillamin hat in geringer Dosierung eher einen fördernden Effekt. Eine geeignete Referenzsubstanz für dieses Testsystem konnte nicht gefunden werden. Angesichts der Tatsache, daß dieses Testsystem auf einem ähnlichen Mechanismus beruht wie die Chemilumineszenz der Makrophagen, konzentrierte man sich in der Folgezeit auf das

zuletzt genannte Modell und verzichtete auf eine Weiterentwicklung der  $H_2O_2$ -Freisetzung durch aktivierte Makrophagen.

*Tab. 2.18: Effekte verschiedener antirheumatisch/immunomodulatorisch-wirkender Verbindungen auf die durch opsonisiertes Zymosan (0,5 mg/ml) induzierte  $H_2O_2$ -Bildung in C.-parvum-aktivierten Peritonealmakrophagen aus Meerschweinchen.*

Substanz	Veränderung der $H_2O_2$ -Sekretion [%]		
	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$ [mol/l]
Indometacin	- 5	- 10	- 24*
Levamisol	- 8	- 14	- 31*
d-Penicillamin	+ 20*	+ 14	- 1
Cyclophosphamid	- 16*	- 7	- 25*

Angegeben sind die Mittelwerte von 3 Bestimmungen.

\*  $p < 0.001$  (vs. Kontrolle; t-Test nach logs)

## **2.8 $\beta$ -Glucuronidase-Freisetzung aus Makrophagen**

### **2.8.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Corynebacterium-parvum-aktivierte Maus-Makrophagen setzen nach Stimulierung mit opsonisiertem Zymosan (OpZ) neben anderen lysosomalen Enzymen  $\beta$ -Glucuronidase frei, deren Aktivität im Kulturmedium über das aus p-Nitrophenyl-glucuronid freigesetzte p-Nitrophenol photometrisch bestimmt werden kann (Methode nach Lin et al., 1975). Die  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität dient als Maß für die oxidationsunabhängige Stimulation von Makrophagen, die in Gegenwart von Substanzen unbeeinflusst, gesteigert oder vermindert sein kann. Hemmer der Makrophagen-Stimulation könnten Therapeutika bei chronischen Entzündungen und Immunerkrankungen sein.

### **2.8.2 Material und Methoden**

#### **2.8.2.1 Versuchstiere**

Männliche CBA-Mäuse (Inzucht), ca. 20 g schwer, werden von Bomholtgård, Ry, Dänemark bezogen und in Makrolon-Käfigen mit Standardfutter (Altromin, Lage) und Wasser ad libitum gehalten.

Raumtemperatur:  $20 \pm 2$  °C

Hell-Dunkel-Rhythmus: 12 h

Luftwechsel: 16fach/h

7 Tage vor dem Versuchstag wird den Tieren jeweils 0,2 ml C. parvum i.p. injiziert.

#### **2.8.2.2 Puffer**

a) PBS-Puffer (10 mmol/l, pH 7,4):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  (Merck; Art. 6580) 17,8 g/l

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  (Merck; Art. 6346) 13,8 g/l

durch Mischen folgender Stammlösungen auf pH 7,4 einstellen:

Für Gebrauch (10 mmol/l Phosphatpuffer):

100 ml 0,1 mol/l Na-Phosphatpuffer  
+ 8 g NaCl (Merck; Art. 6404)  
+ 0,2 g KCl (Merck; Art. 4936)  
-----

ad 1000 ml A. dest. pH 7,4

*b) Glycinpuffer*

1 Teil 0,8 mol/l Glycin (Sigma)  
1 Teil 0,8 mol/l NaCl (Merck)  
1 Teil 0,8 mol/l NaOH (Merck)  
1 Teil Aqua demineralisiert  
-----

pH 10,4

*c) Acetatpuffer*

24,5 ml 1 mol/l Na-acetat  
25,5 ml 1 mol/l Essigsäure  
-----

ad 500 ml Aqua demineralisiert, pH-Wert 4,5.

### **2.8.2.3 Reagenzien**

*a) Enzymsubstrat*

p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucuronid (Calbiochem), 0,15 mmol/l in  
Aqua demineralisiert

*b) Penicillin/Streptomycin (Flow)*

5000 U/l; 5000  $\mu$ g/ml

*c) Medium 199*

Medium 199 (Gibco 3201157) wird 1:1 mit sterilem Aqua  
demineralisiert verdünnt; 1 ml/100 ml Penicillin/Strepto-  
mycin-Lösung wird zugegeben.

*d) Opsonisiertes Zymosan*

Zymosan (Sigma) wird mit Kaninchenserum opsonisiert. Dazu  
wird das Serum mit 2 mg/ml Zymosan bei 37 °C 30 min inkubiert.  
Nach Zentrifugation bei 500 x g 5 min wird das  
Zymosan mit PBS-Puffer auf eine Konzentration von 1 mg  
Zymosan/ml eingestellt.

e) *Corynebacterium parvum*

7 mg/ml, Thiomersol-konserviert (Deutsche Wellcome, Burgwedel, batch no. CA 761)

#### 2.8.2.4 Gewinnung der Makrophagen

Den mit *C. parvum* aktivierten Mäusen wird mit 5 ml PBS-Puffer die Bauchhöhle gespült. Dazu wird auf der Bauchseite ein Teil des Felles entfernt, mit Hilfe einer Kanüle (Nr. 1) der Puffer zügig in die Bauchhöhle injiziert und nach leichtem Massieren der Bauchgegend die Zellsuspension wieder aspiriert. Die gepoolte Zellsuspension von sechs Tieren wird 10 min bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Sediment wird in 1 ml Medium 199 resuspendiert, die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt und auf eine Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellen werden in 24-well-Kulturschalen (1 ml/Schale) für 2 h im Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) inkubiert. Das Medium wird verworfen, der Zellrasen wird 2mal mit Medium gewaschen und mit frischem Medium überdeckt.

#### 2.8.2.5 Durchführung und Auswertung der Untersuchung

Zu den Zellen wird opsonisiertes Zymosan (0,2 mg/ml) und/oder Prüfsubstanzen (in Puffer oder 1 % DMSO gelöst) zugegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Zellüberstände abgenommen und bei 700 x g 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Zur Bestimmung der Freisetzungsrates von  $\beta$ -Glucuronidase wird wie folgt verfahren:

Leerwert	Probe
-----	-----
75 $\mu$ l Medium	75 $\mu$ l Probe (Überstand)
25 $\mu$ l Substrat	25 $\mu$ l Substrat
150 ml Acetatpuffer	150 $\mu$ l Acetatpuffer

Dieser Probenansatz wird für 15-18 h bei 37 °C in ein Schüttelwasserbad gestellt. Nach Ende der Inkubationszeit gibt man zu jeder Probe 1 ml Glycinpuffer und mißt im Photometer bei 405 nm die Extinktion. Die freigesetzte  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität wird aus einer zuvor erstellten Eichkurve (0-24 U) entnommen und in Einheiten pro  $10^5$  Zellen angegeben.



### 2.8.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Stimulation von *C. parvum*-aktivierten Maus-Peritonealmakrophagen führt zu einer Konzentrations- und Zeit-abhängigen Freisetzung des lysosomalen Enzyms  $\beta$ -Glucuronidase (Abb. 2.18).

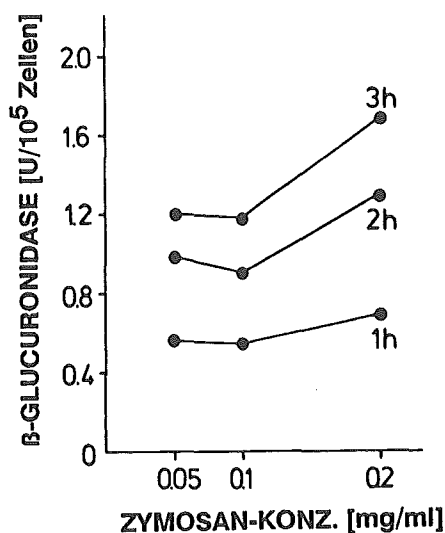


Abb. 2.18: Freisetzung von  $\beta$ -Glucuronidase aus Peritonealmakrophagen der Maus, die 8 Tage mit *C. parvum* aktiviert worden waren nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von opsonisiertem Zymosan über die jeweils angegebene Zeit. Die angegebenen Werte wurden aus Doppelbestimmungen einer repräsentativen Untersuchung ermittelt.

Im Gegensatz zu den Befunden anderer Wissenschaftler (Ringrose et al., 1975; Okimura et al., 1979) konnte kein Effekt der Antiphlogistika Indometacin, Piroxicam, D-Penicillamin oder Levamisol bis zu einer Dosis von  $10^{-5}$  mol/l gemessen werden.

Dexamethason zeigte erst nach 24stündiger Inkubation einen nicht dosisabhängigen Hemmeffekt (Abb. 2.19).

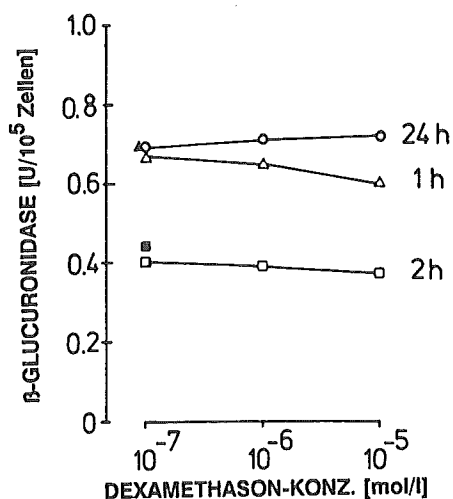


Abb. 2.19: Hemmung der durch OpZ stimulierten  $\beta$ -Glucuronidase-Freisetzung aus *C. parvum*-aktivierten Peritonealmakrophagen der Maus durch Dexamethason. Die Zellen wurden mit dem Wirkstoff für den angegebenen Zeitraum vorinkubiert. Die Kontrollwerte sind mit gefüllten Symbolen angegeben. Alle Werte entstammen ein bzw. zwei repräsentativen Untersuchungen.

Weitere Bemühungen, eine Referenzsubstanz zu finden, die bei kurzzeitiger Inkubation dosisabhängig die  $\beta$ -Glucuronidase-Freisetzung hemmt, waren ohne Erfolg. Es wurde dazu eine Vielzahl von Referenzsubstanzen geprüft, die in verschiedenen Entzündungs- und Immunmodellen wirksam sind. Als inaktiv erwiesen sich hierbei: NDGA (Antioxidanz), Triamcinolon (Corticoid), Phenidon (nicht steroidaler Entzündungshemmer), Bestatin, Cyclosporin A, Cylcophosphamid (Immunmodulatoren und Immunsuppressiva), Azathioprin, Chloroquin (Antirheuma- und Antimalariamittel), Actinomycin (Proteinsynthesehemmer), Trifluoperazin (Calmodulininhibitor), p-Bromphenacylbromid (Phospholipase A<sub>2</sub>-Inhibitor) und Clofibrat (Lipidsenker).

Da beim Einsatz dieses Modells im Screening potentieller Wirksubstanzen in unserem Hause keine Substanz gefunden wurde, die sich als wirksam erwies, wurden die Arbeiten an diesem Modell nicht weitergeführt.

## **2.9 PGE<sub>2</sub>- und LTC<sub>4</sub>-Freisetzung aus Makrophagen**

### **2.9.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Residente Maus-Peritonealmakrophagen sezernieren bei Stimulation mit opsonisiertem Zymosan neben anderen Arachidonsäure-Metaboliten des Cyclooxygenase- und Lipoxxygenase-Weges auch das Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und das Leukotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), die aus dem Kulturmedium extrahiert, adsorptionschromatographisch vorgereinigt und durch Radioimmunoassay quantifiziert werden können. Mit diesem Testsystem lassen sich Substanzen finden, die die Stimulierung der Makrophagen und/oder die Freisetzung von PGE<sub>2</sub> und LTC<sub>4</sub> bzw. deren Synthese hemmen. Den von Makrophagen gebildeten Prostaglandinen und Leukotrienen kommen sowohl bei der Immunantwort als auch bei Entzündungsprozessen wichtige Funktionen zu.

### **2.9.2 Material und Methoden**

#### **2.9.2.1 Versuchstiere**

Männliche CBA-Mäuse (Ivanovas, Kisslegg/Allgäu), 20-30 g schwer, werden à 10 Tiere in einem Makrolonkäfig gehalten. Standardfutter (Altromin, Lage) und Wasser werden ad libitum angeboten.

Raumtemperatur:	20 ± 2 °C
Hell-Dunkel-Rhythmus:	12 h
Luftwechsel:	16fach/h

#### **2.9.2.2 Puffer**

a) PBS-Puffer (10 mmol/l, pH 7,4):

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Merck; Art. 6580) 17,8 g/l

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Merck; Art. 6346) 13,8 g/l

durch Mischen folgender Stammlösungen auf pH 7,4 einstellen:

Für Gebrauch (10 mmol/l Phosphatpuffer):

100 ml 0,1 mol/l Na-Phosphatpuffer  
+ 8 g NaCl (Merck; Art. 6404)  
+ 0,2 g KCl (Merck; Art. 4936)

-----  
ad 1000 ml A. dest. pH 7,4

b) BSS-Puffer

a) Stock I

Dextrose	(Merck; Art. 8342)	10,00 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Merck; Art. 4873)	0,60 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	(Merck; Art. 6580)	2,38 g

-----  
A. dest. ad 1000 ml

b) Stock II

CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	(Merck; Art. 2381)	1,86 g
KCl	(Merck; Art. 4436)	4,00 g
NaCl	(Merck; Art. 6404)	80,00 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	(Merck; Art. 5833)	2,22 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	(Merck; Art. 5886)	2,00 g

-----  
A. dest. ad 1000 ml

bei 4 °C aufbewahren !

Für Gebrauch: 100 ml Stock I  
100 ml Stock II  
-----  
ad 1000 ml A.dest. pH 7,2 - 7,4

### 2.9.2.3 Reagenzien

a) Penicillin/Streptomycin (Flow)

5000 U/ml; 5000 µg/ml

b) Opsonisiertes Zymosan (OpZ)

Zymosan, Sigma Z-4250

Aus Kaninchenblut wird Serum gewonnen. Pro ml Serum werden 2 mg Zymosan zugegeben und bei 37 °C 30 min inkubiert. Das Zymosan wird bei 1000 x g 5 min abzentrifugiert und mit BSS-Puffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt.

c) RIA-Kits  $^{125}\text{J-PGE}_2$  und  $^3\text{H-LTC}_4$   
NEN, DuPont de Nemours, 6072 Dreieich

d)  $\text{C}_{18}$ -Säulen  
Waters GmbH No. 51910

#### 2.9.2.4 Gewinnung der Makrophagen

Mäuse werden durch Genickstreckung getötet und die Makrophagen mit PBS-Puffer aus der Bauchhöhle gespült (2x5 ml-Spritze). Die Zellzahl wird im Coulter Counter (Modell DN, Kapillare 500  $\mu$ , weiße Zellen, threshold control 25) ermittelt und die Zellsuspension bei 300 x g 10 min zentrifugiert. Danach werden die Zellen auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Medium 199 (50 ml Medium 199 + 50 ml steriles Aqua bidest. + 2 ml Penicillin/Streptomycin) resuspendiert und jeweils 1 ml/well auf eine 24-well-Zellplatte (NUNC) gegeben. Die Makrophagen wachsen nach 2-2,5 Stunden bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  (Brutschrank) an. Die Überstände werden danach abpipettiert und verworfen. Die adhärennten Zellen werden mit 1 ml Medium 199 (+ Penicillin/Streptomycin) zweimal gewaschen.

#### 2.9.2.5 Durchführung und Auswertung der Untersuchung

Die zu prüfende Substanz ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  und  $10^{-5}$  mol/l), gelöst in 1 ml Medium 199 (mit Penicillin/Streptomycin) - wenn nötig, vorgelöst in Ethanol (0,5 % Endkonzentration) -, wird 1 h mit den Zellen vorinkubiert, dann wird 3 h ohne bzw. mit opsonisiertem Zymosan bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  stimuliert. Dabei wird 1 ml opsonisiertes Zymosan (Endkonzentration 0,5 mg/ml) zugesetzt. Als Referenzsubstanz dient Indometacin ( $10^{-8}$  mol/l). Das folgende Schema gibt eine Übersicht über die einzelnen Versuchsansätze:

Für die Säulenchromatographie wird 1 ml Zellüberstand auf die vorbehandelten (3-4 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , danach 3-4 ml Methanol)  $\text{C}_{18}$ -Kartuschen gegeben. Die Proben werden mit 3-4 ml Methanol in Rundkolben (25 ml) eluiert. Das Eluat wird bei 37 °C (Büchi, Rotavapor) eingedampft und kann, wenn notwendig, einige Tage bei -20 °C gelagert werden. Die Proben werden in 1 ml RIA-Puffer aufgenommen. Der Radioimmunoassay mit  $^{125}\text{J-PGE}_2$  oder

$^3\text{H-LTC}_4$  wird nach Vorschrift und mit Reagenzien der Fa. NEN durchgeführt.

a) *TRACER* (bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ):

1:20 für  $\text{PGE}_2$  oder 1:100 für  $\text{LTC}_4$  mit Puffer verdünnen

Pro Substanz:	6 x 100 $\mu\text{l}$
+ Referenz (Indometacin)	2 x 100 $\mu\text{l}$
+ Kontrolle (ohne Substanz)	2 x 100 $\mu\text{l}$
+ Leerwert (ohne OpZ)	2 x 100 $\mu\text{l}$
+ Totalaktivität	2 x 100 $\mu\text{l}$
+ Blank	2 x 100 $\mu\text{l}$
+ "O"-Standard	2 x 100 $\mu\text{l}$
+ Standard	14 x 100 $\mu\text{l}$

-----  
32 x 100  $\mu\text{l}$  = 3,2 ml

b) *Antikörper*:

Die Antikörper werden in 13 ml Puffer gelöst ( $\text{PGE}_2$ ) oder direkt eingesetzt ( $\text{LTC}_4$ ). Die Antikörper-Lösung ist bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  mindestens 2 Monate haltbar.

c) *Standard* (bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ):

Röhr- chen	Verdünnungsschema	$\text{PGE}_2$ -RIA	$\text{LTC}_4$ -RIA
		Konz. [pg/0,1 ml]	Konz. [ng/0,1 ml]
a	0,1 ml Standard + 1,9 ml AP*	500	1,6
b	0,1 ml der Lösung a + 1,9 ml AP*	25	0,8
c	0,4 ml der Lösung b + 0,6 ml AP*	10	0,4
d	0,4 ml der Lösung c + 0,4 ml AP*	5	0,2
e	0,4 ml der Lösung d + 0,4 ml AP*	2,5	0,1
f	0,4 ml der Lösung e + 0,6 ml AP*	1,0	0,05
g	0,4 ml der Lösung f + 0,4 ml AP*	0,5	0,025
h	0,4 ml der Lösung g + 0,4 ml AP*	0,25	-

\* AP = Assaypuffer

Die Lösungen b-h für  $\text{PGE}_2$  und b-g für  $\text{LTC}_4$  werden als Standards eingesetzt.

d) *Puffer*:

ist gebrauchsfertig und wird bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert

e) Fällungsreagenz:

ist gebrauchsfertig und wird bei 4 °C gelagert

Alle Lösungen sollen Raumtemperatur haben.

Die Reagenzröhrchen müssen einzeln beschriftet werden. Von jeder Probe werden Doppelbestimmungen gemacht.

Es wird folgendermaßen pipettiert:

#### *I. Schema für die PGE<sub>2</sub>-Bestimmung*

	Röhr- chen Nr.	Puffer [μl]	Standard [μl]	Probe [μl]	Tracer [μl]	Anti- körper [μl]
"total counts"	1-2	-	-	-	100	-
Blank	3-4	200	-	-	100	-
"0"-Standard	5-6	100	-	-	100	100
Standards	7-20	-	100	-	100	100
Proben	21...	-	-	100	100	100

Zuerst werden Proben, Standards und Puffer pipettiert, danach Tracer, und es wird gut gemischt. Zuletzt wird das Antiserum dazu pipettiert und mit einem Schüttler 2-5 sec jede Probe gemischt.

Die Proben werden über Nacht 16-24 h bei 2-8 °C inkubiert. Danach wird zu jeder Probe 1 ml Fällungsreagenz (eiskalt) gegeben mit Ausnahme des Ansatzes "Total counts". Es wird gut gemischt und 20-30 min auf Eis stehengelassen. Nach Zentrifugation bei 4 °C bei 1.000-2.000 x g werden die Proben - wieder mit Ausnahme von "Total counts" - dekantiert und das Sediment im Gamma-Counter (LKB 1274 RIA Gamma) gemessen.

Der Gamma-Counter druckt sowohl die Standardkurve als auch die Konzentrationen (Mittelwert der Doppelbestimmung) an PGE<sub>2</sub> aus. Falls die Proben nach dem Aufnehmen des eingedampften Eluats verdünnt wurden, muß dieser Faktor noch berücksichtigt werden. Hemmung bzw. Stimulation durch Prüfsubstanz wird prozentual zur Kontrolle (= 100 %) ausgerechnet.

## II. Schema für die LTC<sub>4</sub>-Bestimmung

	Röhr- chen-Nr.	Puffer [μl]	Standard [μl]	Probe [μl]	Tracer [μl]	Anti- körper [μl]
"total counts"	1-2	700	-	-	100	-
Blank	3-4	200	-	-	100	-
"O"-Standard	5-6	100	-	-	100	100
Standards	7-20	-	100	-	100	100
Proben	21...	-	-	100	100	100

Zuerst werden Puffer und danach Tracer wie oben pipettiert und gut gemischt. Jetzt wird das Antiserum dazugegeben und wieder jede Probe gemischt (2-5 sec).

Der Ansatz wird über Nacht (16-24 h) bei 4-8 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Proben auf Eis gesetzt. Zu jeder Probe - bis auf den Ansatz "total counts" - werden 500 μl Kohlesuspension pipettiert und danach 2-5 sec auf dem Schüttler gemischt. Nach 15 min unter Eiskühlung werden die Proben bei 4 °C zentrifugiert (100-200 x g, 15 min). Der Ansatz "total counts" und die jeweiligen Überstände werden zu 2 ml Szintillationsflüssigkeit dekantiert und im Beta-Counter (LKB 1216 RackBeta II) 2 min gemessen.

Aus den Standardwerten wird eine Kurve (B/B<sub>0</sub> über zugesetztes LTC<sub>4</sub>/ng) halblogarithmisch gezeichnet. Hierbei ist

$$\% B/B_0 = \frac{\% B \text{ des Standards}}{\% B \text{ des "O"-Standards}} \times 100$$

Für die Proben können die LTC<sub>4</sub>-Werte in ng/0,1 ml abgelesen werden. Hemmung bzw. Stimulation durch Prüfsubstanzen wird prozentual zur Kontrolle (=100 %) ausgerechnet.



### 2.9.3 Ergebnisse und Diskussion

Erste Experimente bestätigten, daß *C. parvum*-aktivierte Maus-Makrophagen nach Stimulation weniger  $\text{PGE}_2$  sezernieren als residente Makrophagen (Tab. 2.19; siehe auch Scott et al., 1982).

Daher wurden für die weiteren Untersuchungen residente Makrophagen benutzt.

Tab. 2.19: Freisetzung von  $\text{PGE}_2$  aus *C.-parvum*-aktivierten bzw. residenten Makrophagen der Maus nach Stimulation mit opsonisiertem Zymosan.

Zelltyp	$\text{PGE}_2$ [ng/ml/2 x 10 <sup>6</sup> Zellen]
residente Makrophagen	2.07 ± 0.03
<i>C. parvum</i> aktiviert	1.11 ± 0.05

Es sind Mittelwerte ± Standardabweichung vom Mittelwert von 3 Bestimmungen angegeben.

In der Folgezeit wurden 140 Substanzen auf Hemmung der  $\text{PGE}_2$ -Freisetzung aus mit opsonisiertem Zymosan (OpZ-)stimulierten residenten peritonealen Maus-Makrophagen in vitro geprüft, wobei einige eine deutliche Aktivität zeigten (Tab. 2.20), darunter klassische Inhibitoren der Prostaglandin-Synthese sowie Substanzen, die in unseren Laboratorien entwickelt worden waren.

Wie erwartet war Indometacin ein potenter Inhibitor der  $\text{PGE}_2$ -Freisetzung und hemmte in einem Ex-vivo-Versuch nach 2tägiger oraler Applikation an Mäusen die Makrophagen- $\text{PGE}_2$ -Freisetzung mit einer  $\text{ID}_{50}$  vom 6 mg/kg. Die Substanz 2101/499 steigerte hingegen die Makrophagen- $\text{PGE}_2$ -Freisetzung; dieser Effekt könnte sowohl durch eine zusätzliche Stimulation der Makrophagen als auch durch einen Eingriff in den Arachidonsäure-Metabolismus bedingt sein.

Tab. 2.20: Wirkung verschiedener Verbindungen auf durch OpZ stimulierte residente Peritonealmakrophagen der Maus in vitro. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 getrennt durchgeführten Untersuchungen. Es sind diejenigen Konzentrationen angegeben, bei denen die stärksten Effekte auftraten.

Substanz	Konzentration [mol/l]	% Veränderung in Bezug auf PGE <sub>2</sub>
Indometacin	10 <sup>-7</sup>	- 91
Ebselen (PZ 51)	10 <sup>-5</sup>	- 30
2101/499	10 <sup>-5</sup>	+ 81

Nach Etablierung des Radioimmunoassays für die Quantifizierung von LTC<sub>4</sub> wurde eine Anzahl von Inhibitoren der PGE<sub>2</sub>-Bildung bzw. -Sekretion für die Prüfung auf Hemmung der LTC<sub>4</sub>-Freisetzung ausgewählt. Die Ergebnisse, die mit 4 verschiedenartig wirksamen Verbindungen erzielt wurden, sind in den Abbildungen 2.20a und b dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, daß die gewählten Substanzen unter den Testbedingungen unterschiedliche Effekte auf die PGE<sub>2</sub>- und LTC<sub>4</sub>-Bildung bzw. -Freisetzung zeigen. Da PGE<sub>2</sub> ein Produkt des Cyclooxygenase-Weges und LTC<sub>4</sub> ein Produkt des Lipxygenase-Weges ist, bietet dieser Test die Möglichkeit, die Wirkung von Prüfsubstanzen auf die beiden Metabolisierungswege der Arachidonsäure herauszufinden und zu vergleichen.

Zu diesem Zweck wurden mehr als 100 Substanzen, hauptsächlich aus den eigenen Laboratorien, auf Beeinflussung sowohl der PGE<sub>2</sub>- als auch der LTC<sub>4</sub>-Freisetzung aus Makrophagen geprüft. Einige dieser Substanzen beeinflussten die Eicosanoid-Freisetzung deutlich (Tab. 2.21).

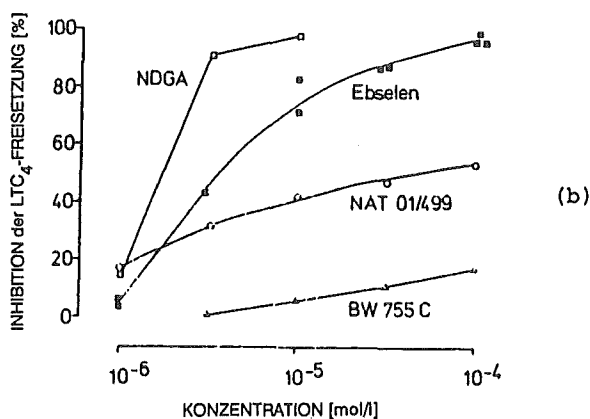
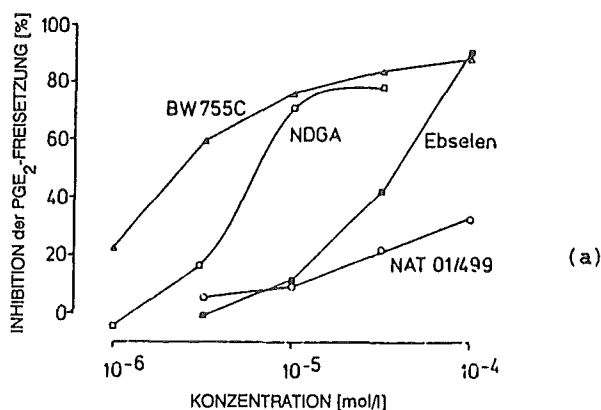


Abb. 2.20: Hemmung der (a) PGE<sub>2</sub>- und (b) LTC<sub>4</sub>-Freisetzung aus residenten Peritonealmakrophagen der Maus durch BW 755C, Nordihydroguarensäure, Ebselen und NAT 01-499. Adhärenzte Zellen ( $2 \times 10^6$ /ml Medium 199) wurden 10 min vor der Stimulation mit opsonisiertem Zymosan (0,17 mg/ml) mit der jeweiligen Testsubstanz vorinkubiert. Nach Inkubation über 3 h bei 37 °C wurden die Überstände entnommen und PGE<sub>2</sub>, wie auch LTC<sub>4</sub> nach Extraktion mit Hilfe von Sep-Pak-C18-Säulen durch Radioimmunoassay bestimmt. Die PGE<sub>2</sub>- und LTC<sub>4</sub>-Spiegel in Gegenwart der Testverbindungen sind in Prozent der Kontrollwerte angegeben. Die Resultate entstammen Doppelbestimmungen aus jeweils 3 getrennten Untersuchungen. Sofern mehrere identische Symbole angegeben sind, wurden die Daten aus getrennten Untersuchungsserien gewonnen.

Aus den Ergebnissen der Tabelle 2.21 wird deutlich, daß die Hemmung der PGE<sub>2</sub>- und die der LTC<sub>4</sub>-Freisetzung nicht immer miteinander korrelieren.

Tab. 2.21: Prozentuale Hemmung der Eicosanoid-Freisetzung aus kultivierten Peritonealmakrophagen der Maus.

Substanz	% Inhibition bei 10 $\mu$ mol/l	
	PGE <sub>2</sub>	LTC <sub>4</sub>
Revlon 5901	- 86	- 100
NAT 04-159	- 75	+ 16
NAT 02-748		+ 13
NAT 02-801		- 77
NAT 06-123	- 90	- 54
NAT 06-051	- 33	- 74
NAT 02-761	- 86	- 100
NAT 06-484	- 50	+ 36
NAT 04-487	- 23	- 37

Um zu eruieren, ob die durch intrapleurale Injektion von Carragenin ausgelöste Pleuritis bei Ratten ein geeignetes In-vivo-Modell darstellen könnte, in dem die in den beschriebenen In-vitro-Tests wirksamen Substanzen weiter evaluiert werden könnten, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Carragenin-Injektion Exsudat-Proben entnommen und der PGE<sub>2</sub>- und LTC<sub>4</sub>-Gehalt mittels Radioimmunoassay bestimmt. Abbildung 2.21 zeigt, daß die PGE<sub>2</sub>-Konzentration bereits nach 2 h ein Maximum erreicht, während maximale LTC<sub>4</sub>-Konzentrationen erst 24 h bei weiblichen und nach 48 h bei männlichen Tieren gemessen werden konnten.

Zur Korrelierung der in vitro erzielten Ergebnisse mit In-vivo-Daten wurde als erste Substanz Ebselen in der Carragenin-induzierten Pleuritis an der Ratte geprüft. Bei einer Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht konnte eine 27 %ige Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Freisetzung in das Pleural-Exsudat festgestellt werden. Da jedoch das Volumen relativ gering ist, wurden weitere Untersuchungen im Modell der Zymosan-induzierten Pleuritis durchgeführt.

Da sich bei der Zymosan-induzierten Pleuritis nur die Leukozytenzahl signifikant von der in der CAR-induzierten Pleuritis unterscheidet, stellt dieser methodische Ansatz keine

Alternative zur Carragenin-induzierten Pleuritis dar (Tab. 2.22).

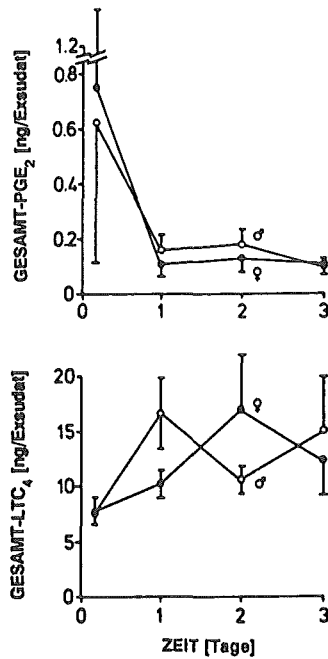


Abb. 2.21: PGE<sub>2</sub>- und LTC<sub>4</sub>-Spiegel in Pleural-Exsudaten zu verschiedenen Zeiten nach intrapleuraler Injektion von Carragenin. Die Werte stellen Mittelwerte und mittlere Standardabweichungen aus 5-8 Beobachtungen unter Berücksichtigung des Gesamtvolumens des Exsudats dar.

Weitere In-vivo-Versuche wurden nicht durchgeführt.

Mittlerweile waren Testsysteme etabliert worden, bei denen die Bildung von Eicosanoiden durch Leukozyten routinemäßig mittels HPLC und TLC bestimmt wurde (siehe Kap. 2.12). So trat die zeitaufwendige und teure Messung der PGE<sub>2</sub>- und LTC<sub>4</sub>-Freisetzung aus Makrophagen mittels Radioimmunoassay in den Hintergrund, zumal die Substanzen, die in diesem Modell wirksam waren, zumeist auch inhibitorische Effekte auf die Bildung von Leukotrienen in Leukozyten hatten (Tab. 2.23). Daher wurde die PGE<sub>2</sub>- und LTC<sub>4</sub>-Freisetzung aus Makrophagen nur noch als zusätzliches Testsystem betrachtet, mit Hilfe

dessen die inhibitorischen Effekte von Testsubstanzen auf verschiedene Zelltypen verglichen werden können.

Tab. 2.22: Vergleichende Darstellung von Ergebnissen aus Carragenin (CAR)- und Zymosan-induzierter Pleuritis bei Wistar-Ratten (Körpergewicht ca. 180 g).

	Carragenin	Zymosan
Exsudate [ml]	1,41 ± 0,1	1,76 ± 0,16
Leukozyten-Konz. [x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ] ± S.E.M.	89,8 ± 7,6	56,64* ± 8,8
PGE <sub>2</sub> [PG/ml] ± S.E.M.	321,6 ± 62,5	410,8 ± 46,9

\* p ≤ 0,05 gegen CAR

Tab. 2.23: Vergleichende Darstellung der Hemmeffekte von Testsubstanzen auf die Freisetzung von LTC<sub>4</sub> und PGE<sub>2</sub> (Bestimmung durch Radioimmunoassay) aus Makrophagen, auf die Aktivitäten der 5-Lipoxygenase (5-LO) und Cyclooxygenase (CO) aus Leukozyten (Bestimmung nach Dünnschichtchromatographie und auf die Bildung von LTB<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>-F) (Bestimmung nach HPLC).

Substanz	MO-PGE <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> [µmol/l]			
		CO	MO-LTC <sub>4</sub>	5-LO	LTB <sub>4</sub> -F
Ebselen	20	4	3,6	30	2,7
NAT 01-499	100	50	30	45	
NAT 04-159	40	>500	25	130*	10
NAT 06-025	2,3		-	10	
NDGA	6,2	0,7	1,5	1,5	
BW 755 C	1	3,2	7	31	
BW 540 C	10	2,6	1	10	
Piriprost	>30	>500	1	35	

\* zytolytisch

## **2.10 Neutrophilen-Aggregation**

### **2.10.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

In Anwesenheit von chemotaktischen Faktoren wie dem Peptid der Struktur Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP), dem Komplementfaktor C5a und dem 5-Lipoxygenase-Produkt Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) aggregieren neutrophile Granulozyten, wobei das Ausmaß der Aggregation in einem Aggregometer gemessen werden kann. Die physiologische Bedeutung dieser Aggregation liegt möglicherweise im Festhalten der Leukozyten im entzündeten Gewebe. Wird die Aggregation in vitro durch das Kalzium-Ionophor A23187 ausgelöst, so ist sie zu mehr als 95 % der Wirkung des LTB<sub>4</sub> zuzuschreiben (Ford-Hutchinson et al., 1980). Substanzen, die diese Reaktion hemmen, stellen folglich potentielle 5-Lipoxygenase-Inhibitoren dar, wobei Kontrollreaktionen mit FMLP und PAF Aussagen über die Spezifität der Substanzwirkung möglich machen. Lipoxygenase-Inhibitoren können wertvolle Antiphlogistika sein.

### **2.10.2 Material und Methoden**

#### **2.10.2.1 Puffer**

a) PBS-Puffer (10 mmol/l, pH 7,4):

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Merck; Art. 6580) 17,8 g/l

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Merck; Art. 6346) 13,8 g/l

durch Mischen folgender Stammlösungen auf pH 7,4 einstellen:

Für Gebrauch (10 mmol/l Phosphatpuffer):

100 ml 0,1 mol/l Na-Phosphatpuffer

+ 8 g NaCl (Merck; Art. 6404)

+ 0,2 g KCl (Merck; Art. 4936)

-----

ad 1000 ml A. dest. pH 7,4

b) BSS-Puffer

a) Stock I

Dextrose	(Merck; Art. 8342)	10,00 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Merck; Art. 4873)	0,60 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	(Merck; Art. 6580)	2,38 g

A. dest. ad 1000 ml

b) Stock II

CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	(Merck; Art. 2381)	1,86 g
KCl	(Merck; Art. 4436)	4,00 g
NaCl	(Merck; Art. 6404)	80,00 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	(Merck; Art. 5833)	2,22 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	(Merck; Art. 5886)	2,00 g

A. dest. ad 1000 ml

bei 4 °C aufbewahren !

Für Gebrauch:      100 ml Stock I  
                         100 ml Stock II

ad 1000 ml A.dest. pH 7,2 - 7,4

**2.10.2.2 Reagenzien**

a) 5 %iges Dextran

5 g Dextran T 250 (Fa. Roth) /100 ml PBS-Puffer

b) 2,0 %iges BSA

Albumin Bovine (Sigma)

2,0 g Albumin/100 ml PBS-Puffer - bei 4 °C aufbewahren !

c) ACK-Lyse-Puffer

NH <sub>4</sub> Cl (Merck)	8,30 g
KHCO <sub>3</sub> (Merck)	1,00 g
EDTA (Merck)	0,037 g

A. dest. ad 1000 ml

bei 4 °C aufbewahren !



### 2.10.2.3 Aggregationsauslöser

- a) Ionophor A23187 (Boehringer, Mannheim) wird als Stammlösung  $2,7 \times 10^{-3}$  mol/l in DMSO bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und als Auslöser bis  $1 \times 10^{-6}$  mol/l mit PBS verdünnt.
- b) PAF (rac-C16-PAF, NAT 04-216, Nattermann) wird als Stammlösung  $2,7 \times 10^{-3}$  mol/l in DMSO bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und als Auslöser bis  $1 \times 10^{-7}$  mol/l mit PBS verdünnt.
- c) Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP, Sigma) wird als Stammlösung  $2,7 \times 10^{-3}$  mol/l in DMSO bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und als Auslöser bis  $1 \times 10^{-7}$  mol/l mit PBS verdünnt.

### 2.10.2.4 Präparation der Schweineleukozyten

Frisches Schweineblut vom Schlachthof wird 10:1 mit 3,8%igem Na-citrat (Merck) versetzt und gut gemischt. In dieser Form kann das Blut 2 Tage bei Kühlschranktemperatur gehalten werden.

Das Blut wird mit PBS-Puffer 1:5 verdünnt. Danach werden 40 ml verdünntes Blut mit 10 ml Ficoll-Paque (Pharmacia) vorsichtig überschichtet und in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen 20 min bei 2000 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe werden die oberen Schichten bis auf das Blutsediment abgesaugt. Dieses wird in einen Plastikmeßzylinder gegeben, mit PBS auf 80 ml aufgefüllt, mit 20 ml 5 %igem Dextran T 250 versetzt und gut gemischt. Der Zylinder wird mit Parafilm verschlossen und ca. 1 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird der Überstand in Falcon-Röhrchen abpipettiert und 10 min bei 1200 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert und das Sediment in 10 ml eiskaltem ACK-Lyse-Puffer aufgenommen. Dieses wird 5 min in Eiswasser gekühlt, mit PBS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und nochmals 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird wieder dekantiert und das Sediment in 1 ml 2 %igem BSA in PBS resuspendiert. Zur Zählung der Zellen werden 20  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension in 20 ml isotonischer Kochsalzlösung gegeben und im Coulter Counter gezählt (Verdünnung 1:1000).

$$\frac{\text{Anzahl Zellen} \times \text{Verd.}}{\text{Ansaugvolumen (0,5 ml)}} = \text{Zellen/ml}$$

$$\frac{\text{Zellen/ml}}{\text{gewünschte Zellzahl}} = \text{Volumen zum Resuspendieren}$$

$$(2 \times 10^7 \text{ Zellen/ml})$$

Die Zellen werden in dem errechneten Volumen von 2 %igem BSA in PBS-Puffer resuspendiert. Für den Test wird eine Endkonzentration von  $10^7$  Zellen/ml verwendet.

#### *2.10.2.5 Durchführung und Auswertung des Versuchs*

250 µl BSS-Puffer (vorgewärmt auf 37 °C), 250 µl Zellsuspension ( $2 \times 10^7$  Zellen/ml) und 20 µl PBS-Puffer, der die Testsubstanz enthält - wenn nötig in 0,5 % Ethanol oder 0,5 % DMSO -, werden ca. 4 min bei 37 °C und unter Rühren (600 U/min) im Payton-Doppelkanal-Aggregometer, Modell 300B, inkubiert. Es werden entweder 20 µl A23187 ( $1 \times 10^{-6}$  mol/l) oder 20 µl PAF ( $1 \times 10^{-7}$  mol/l) oder FMLP ( $1 \times 10^{-7}$  mol/l) oder 20 µl PBS (Kontrolle) zugesetzt. Die Testzeit beträgt ca. 20 min, bis ein Maximum auf dem Schreiber erreicht wird. Die Substanzeffekte werden prozentual zum Kontrollausschlag in cm (ohne Testsubstanz = 100 %) angegeben. Für die Dreifachbestimmungen werden jeweils verschiedene Zellsuspensionen eingesetzt.

#### *2.10.3 Ergebnisse und Diskussion*

Erste Untersuchungen mit peritonealen Ratten- und Meerschweinchen-Neutrophilen hatten als Ergebnis, daß die durch das Kalzium-Ionophor A23187 ausgelöste Aggregation bei den Leukozyten des Meerschweinchens deutlich besser war als bei denen der Ratte. Weitere durchgeführte Untersuchungen zeigten jedoch große Variabilität in der Reaktion von Meerschweinchen-Leukozyten auf das Kalzium-Ionophor, wobei häufig eine maximale Aggregation nicht ausgelöst wurde. Durch Variation der Kalzium-Konzentration über den Konzentrationsbereich von 0,6 - 4,8 mmol/l ließ sich nur die spontane Aggregation steigern, und auch der Wechsel des Tierstammes brachte keine anderen Ergebnisse. Durch den Lipoxxygenase-/Cyclooxygenase-

Inhibitor NDGA ließ sich die Aggregation inhibieren, allerdings erst bei hohen Konzentrationen (Tab. 2.24).

Tab. 2.24: Hemmung der Kalzium-Ionophor-A23187-induzierten Aggregation von Meerschweinchenleukozyten (PEL) und von Schweineleukozyten (PBL) durch Nordihydroguarensäure (NDGA). Meerschweinchenleukozyten aus dem Peritonealraum wurden 48 h nach Injektion von 3 % Glykogen gewonnen. Schweineleukozyten wurden aus dem Blut mittels Zentrifugation im Ficoll-Gradienten gewonnen. Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung mit 0,5 % Rinderserum-Albumin aufgenommen und mit  $2 \mu\text{mol/l}$  A23187 in einem Payton-Aggregometer stimuliert. Die Stärke der Aggregation wurde aufgezeichnet. Das Ausmaß der Aggregation in Gegenwart der Testsubstanzen wurde ausgedrückt in Prozent der Kontrollwerte. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten aus 2-3 Beobachtungen mit den jeweiligen Spannweiten.

NDGA-Konz. [ $\mu\text{mol/l}$ ]	% Inhibition		
	frisches Schweine-PBL	2 Tages altes Schweine-PBL	frisches Meerschweinchen-PEL
10	-24 (-41/- 6)	-25 (-30/-19)	-
25	-47 (-65/-14)	-53 (-68/-39)	-26 (-33/-16)
50	-84 (-86/-83)	-79 (-83/-75)	-50 (-62/-32)
100	-	-88 (-93/-83)	-86 (-88/-85)

Wurde die Aggregation durch PAF ( $10^{-7}$  mol/l) ausgelöst, hatten verschiedene potentielle Inhibitoren keine Hemmwirkung auf die Aggregation: Superoxiddismutase (SOD, 60 U/ml), Katalase (300-3000 U/ml), Prostaglandin  $E_2$  ( $10^{-8}$  -  $10^{-6}$  mol/l), Isoprenalin als Sympathomimetikum ( $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  mol/l) und Quinacrine als Phospholipase- $A_2$ -Inhibitor ( $5 \times 10^{-7}$  -  $5 \times 10^{-5}$  mol/l).

Im Gegensatz zu Meerschweinchen-Leukozyten ließ sich bei Schweine-Leukozyten die Aggregation gut durch A23187 auslösen (Abb. 2.22) und stärker durch NDGA inhibieren (Tab. 2.24). Daher wurde die durch A23187 ausgelöste Aggregation von

Schweine-Leukozyten (PBL) weiteren Untersuchungen mit Referenzsubstanzen unterzogen.

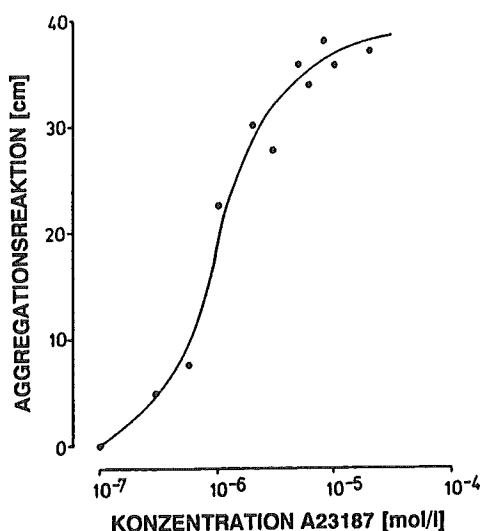


Abb. 2.22: Aggregation von Schweineleukozyten in Abhängigkeit von der Konzentration an Kalzium-Ionophor A23187.

Der 5-Lipoxygenase-Hemmer Piriprost (U60,257) erwies sich als ein relativ schwacher Hemmer der Aggregation; die Substanz NAT 04-159 zeigte keine große inhibitorische Potenz (Tab. 2.25), obwohl von ihr bekannt ist, daß sie relativ spezifisch die LTB<sub>4</sub>-Bildung unterdrückt.

Tab. 2.25: Hemmung der Kalzium-Ionophor-A23187 ( $2 \mu\text{mol/l}$ )-ausgelösten Aggregation von Schweineleukozyten aus Blut ( $1 \times 10^7$  Zellen/ml) durch den 5-Lipoxygenase-Inhibitor Piriprost und die Verbindung NAT 04-159. Die Werte sind Mittelwerte aus 5-6 Beobachtungen mit Standardabweichung vom Mittelwert.

Konzentration [mol/l]	Aggregations-Reaktion [cm]		% der Kontrolle	
	Piriprost	NAT 04-159	Piriprost	NAT 04-159
-	$7,41 \pm 0,76$	$8,49 \pm 1,75$	100	100
$3 \times 10^{-6}$	$6,17 \pm 0,87$	$7,63 \pm 2,1$	83,3	89,9
$1 \times 10^{-5}$	$5,56 \pm 0,91$	$7,68 \pm 1,86$	75,0	90,5
$3 \times 10^{-5}$	$5,00 \pm 0,62$	$6,80 \pm 1,18$	67,5	80,1
$1 \times 10^{-4}$	n.b.	$0,98 \pm 0,54$	n.b.	11,5

n.b. = nicht bestimmt

Mit einem weiteren selektiven Inhibitor der 5-Lipoxygenase, REV 5901A, wurden ähnliche Ergebnisse wie mit dem 5-Lipoxygenase-Inhibitor Piriprost und NAT 04-159 erzielt. Auch REV 5901A zeigte keine nennenswerte Inhibition der Aggregation. So ließen sich also die Ergebnisse von Ford-Hutchinson et al. (1980) nicht bestätigen, daß die durch A23187 ausgelöste Neutrophilen-Aggregation der Wirkung des  $\text{LTB}_4$  zuzuschreiben ist. Dieser Versuchsansatz wurde daher nicht weiterverfolgt.

Für weitere Untersuchungen der Leukozyten-Aggregation wurde PAF als Auslöser eingesetzt. Dabei erwies sich der PAF-Antagonist Kadsurenon als ein kompetitiver Inhibitor der durch PAF ausgelösten Leukozyten-Aggregation (Abb. 2.23).

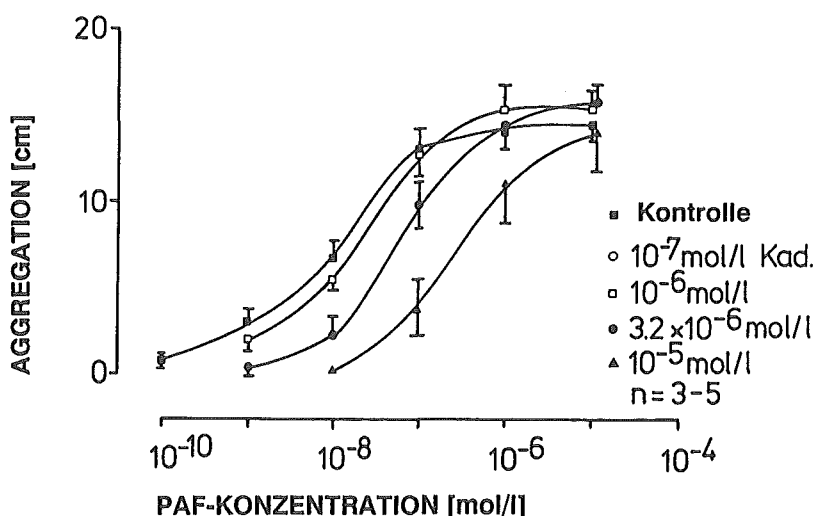


Abb. 2.23: Dosis-Wirkungs-Kurven des PAF-Rezeptor-Antagonisten Kadsurenon (Kad.) in verschiedenen Konzentrationen für die PAF-induzierte Aggregation von Schweineleukozyten. Die Werte sind Mittelwerte aus 3-5 getrennten Untersuchungen mit Standardabweichungen vom Mittelwert.

In Kapitel 2.6 wurde bereits über Untersuchungen berichtet, in denen die Aktivität von Kadsurenon als PAF-Rezeptor-Antagonist in der PAF-induzierten Chemilumineszenz an Meer-schweinchen-Makrophagen und in der Aggregation von Neutrophilen aus peripherem Schweineblut verglichen wurde. Dabei hatte sich gezeigt, daß die Affinität der Substanz zu den Rezeptoren der Leukozyten, die mit Hilfe der Aggregation bestimmt worden war, 100fach schwächer war als die zu den Rezeptoren der Makrophagen. Darüberhinaus wurde mit NAT 05-333 ein weiterer kompetitiver Inhibitor gegenüber der PAF-induzierten Neutrophilen-Aggregation gefunden, der eine konzentrations-abhängige Wirkung zeigt (Abb. 2.24).

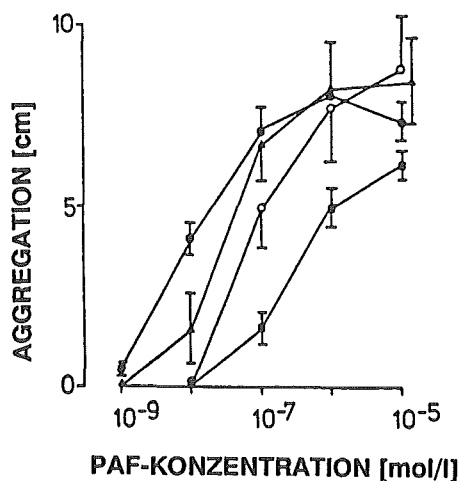


Abb. 2.24: Dosis-Wirkungs-Kurven für die PAF-induzierte Aggregation von Schweineleukozyten (PBL) in Abhängigkeit von NAT 05-333 in den Konzentrationen  $1 \times 10^{-5}$  mol/l (▲),  $3,2 \times 10^{-5}$  mol/l (○) und  $1 \times 10^{-4}$  mol/l (■). Die Kontrollkurve (●) wurde in Abwesenheit von NAT 05-333 ermittelt. Die Werte sind Mittelwerte aus 8-14 Einzelbeobachtungen (für die Kontrolle) und 4-6 Einzelbeobachtungen in Gegenwart von NAT 05-333 einschließlich der Standardabweichungen vom Mittelwert.

Um das Modell der Neutrophilen-Aggregation als Testsystem für die Auffindung von PAF-Antagonisten zu validieren, wurden weitere bekannte PAF-Antagonisten geprüft und aus den Dosis-Wirkungs-Kurven die  $pA_2$ -Werte ermittelt (Tab. 2.26). Unter Standardbedingungen ( $10^{-7}$  mol/l PAF) zeigte BN 52021 keine Hemmwirkung, während SRI 62119 ( $10^{-5}$  mol/l) und L-652,731 ( $10^{-6}$  mol/l) Inhibitionen von 61 bzw. 44 % aufwiesen.

Tab. 2.26:  $pA_2$ -Werte für verschiedene PAF-Antagonisten, ermittelt aus den Dosis-Wirkungs-Kurven der PAF-induzierten Aggregation von Schweineleukozyten aus Blut, sowie die prozentuale Hemmung der Aggregation bei einer PAF-Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l und einer Konzentration der Antagonisten von  $10^{-6}$  mol/l.

Antagonist	$pA_2$ -Wert	% Inhibition
Kadsurenon	5,90 ( $\pm$ 0,454) (n=4)	- 55
BN 52021	5,30 ( $\pm$ 0,499) (n=8)	+ 8
SRI 63119	5,78 ( $\pm$ 0,248) (n=7)	- 12
L-652,731	6,91 ( $\pm$ 0,168) (n=10)	- 44
Alprazolam	5,90 ( $\pm$ 0,261) (n=9)	+ 9

Das Modell der PAF-induzierten Neutrophilen-Aggregation konnte somit als exzellentes Modell zur Auffindung von PAF-Antagonisten etabliert werden.



## *2.11 Inhibition der Arachidonsäure-Freisetzung*

### *2.11.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit*

Nach ihrer Freisetzung aus den Membran-Phospholipiden führt die durch die Enzyme Cyclooxygenase und 5-Lipoxygenase katalysierte Oxidation der Arachidonsäure zu den Prostaglandinen und Leukotrienen, die als Mediatorsubstanzen große Bedeutung bei Entzündung, Schmerzentstehung, Allergie und Bluthochdruck haben. Eine Möglichkeit, die Entstehung dieser pathophysiologisch bedeutsamen Mediatoren zu verhindern, ist die Hemmung der membrangebundenen Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), welche nach ihrer Aktivierung die Freisetzung der Arachidonsäure aus Membran-Phospholipiden katalysiert.

In Rattenendothelzellen wird die Arachidonsäure nach Freisetzung über die Cyclooxygenase zu Prostacyclin und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) oxidiert. Nach 24stündiger Inkubation dieser Zellen mit <sup>14</sup>C-markierter Arachidonsäure befindet sich diese Fettsäure fast quantitativ in der Phospholipidfraktion dieser Zellen und kann durch einen geeigneten Stimulus (z.B. PAF, Thrombin, Kalziumionophor A23187) freigesetzt werden. Substanzen mit direkter oder indirekter PLA<sub>2</sub>-hemmender Wirkung vermindern die Freisetzungsrates, die sich mit Hilfe des HPLC und eines Radiodetektors über die freie Arachidonsäure und das entstandene PGE<sub>2</sub> und 6-K-PGF<sub>1α</sub> - das Zerfallsprodukt des instabilen Prostacyclins - messen läßt.

Das Prüfsystem "Arachidonsäurefreisetzung aus Endothelzellen" erlaubt auch die Auffindung von indirekt wirkenden PLA<sub>2</sub>-Inhibitoren wie den Glucokortikoiden. Antiinflammatorisch wirkende Steroide induzieren die Biosynthese eines Proteins (Lipocortin) mit PLA<sub>2</sub>-hemmenden Eigenschaften. Die Wirkung solcher Substanzen läßt sich daher erst nach längerer Vorinkubationsdauer (> 5 h) in Endothelzellen nachweisen.

## **2.11.2 Material und Methoden**

### **2.11.2.1 Reagenzien**

Als Substrat wird ( $1-^{14}\text{C}$ )-Arachidonsäure (spez. Akt. 54,5 Ci/mol) von NEN (Dreieich) verwendet. Alle weiteren benutzten Chemikalien hatten p.a.-Qualität.

Die zu untersuchenden Prüfsubstanzen werden in Ethanol oder PBS gelöst (Stammlösung 2 mmol/l) und bei einer Endkonzentration von 20  $\mu\text{mol/l}$  geprüft.

### **2.11.2.2 Kulturmedien und Lösungen**

1. Minimum Essential Medium,  
nach Dulbecco (DMEM, Boehringer Mannheim Nr.210048)

DMEM Pulverkonzentrat (für 5 l Medium)

- + 18,5 g  $\text{NaHCO}_3$
- + 0,5 g Streptomycinsulphat
- + 0,3 g Penicillin G (500000 IU)

wird mit bidest. Wasser auf 5 l aufgefüllt und nach 15-30 minütigem Rühren sterilfiltriert (Filter 0,2  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schüll, Nr.401352).

Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA, 100fach konzentriert, Boehringer Mannheim) werden vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Fötales Kälberserum (FKS, Seromed, verschiedene Chargen) wird zur Inaktivierung von Proteasen 2 h bei 56°C hitzeinaktiviert und vor Gebrauch 10 % (v/v) dem Flüssigmedium zugefügt.

Als DMEM-Medium wird im folgenden grundsätzlich das Nährmedium einschließlich  $\text{NaHCO}_3$ , NEAA und Antibiotika bezeichnet. Der Zusatz von FKS wird gesondert aufgeführt.

2. Phosphate buffered saline (PBS):

8,0 g NaCl

0,2 g KCl

1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

werden mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt, der pH-Wert beträgt 7,0.

3. Trypsinlösung

100 ml 0,25 %ige Trypsinlösung (Flow, Nr.1689454) wird mit 7 ml einer 1 %igen EDTA-Lösung (in sterilem PBS-Puffer) versetzt.

*2.11.2.3 Anlegen einer Kaninchenaorten-Primärkultur*

Ein ca. 5 cm langes Aortensegment wird aus dem thorakalen Bereich frisch entnommen und die Blutreste durch intensives Waschen in PBS entfernt. Fettgewebe wird mittels eines sterilen Skalpells entfernt, die Aorta nach erneuten Waschen in PBS mittels einer heißsterilisierten Schere (2 h, 180 °C) in ca. 5 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und 24 h mit DMEM/10 % FKS/Dispase I (1 U/ml, Boehringer Mannheim, Nr. 210455) bei 37 ° im Brutschrank inkubiert. Das Medium wird anschließend bei 2000 Upm abzentrifugiert (Labofuge 6000), das verbleibende Pellet einmal mit DMEM gewaschen und nach Zugabe von DMEM/10 % FKS erneut im Brutschrank 24 h inkubiert. Die nicht von der Dispase abgebauten Gewebsreste werden abgesaugt und die adhärenen Kaninchenaortenzellen bis zur Konfluenz kultiviert.

*2.11.2.4 Subkultivierung der Kaninchenaortenzellen*

Alle Arbeitsgänge erfolgen unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank, sterile Verbrauchsware, Pipetten)

- das Medium wird abgesaugt
- 2 ml Trypsinlösung wird zusetzt (NUNC-Petrischalen, d=10 cm, Nr.150350
- Nach 5 min bei 37 °C wird die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, in dem 2 ml DMEM/10 % FKS vorgelegt waren

- es wird bei 2000 Upm zentrifugiert (Labofuge 6000, Heraeus), 1 min
- der Überstand wird abgesaugt, und das Zellpellet wird in 5 ml DMEM/10 % FKS suspendiert
- die Zentrifugation wird bei gleichen Bedingungen wiederholt
- der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet wird in 5 ml DMEM/10 % FKS aufgenommen und auf fünf neue Petrischalen, die jeweils 10 ml DMEM/10 % FKS enthalten, verteilt
- Um die Kaninchenaortenzellen einzufrieren, wird das Zellpellet in 1 ml DMEM/10 % FKS/10 % DMSO suspendiert und in eine Ampulle (NUNC, Nr. 363401) pipettiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren

#### **2.11.2.5 Markierung von Rattenendothelzellen mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure**

Rattenendothelzellen-Monolayer (NUNC Petrischale, d = 10 cm) werden 16 h in DMEM/10 % FKS mit  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure (54,5 Ci/mol, 0,03  $\mu\text{Ci/ml}$ ) inkubiert, um die markierte Arachidonsäure in die Phospholipide der Zellen zu integrieren. Nach 16 h wird zu einem Teil der Zellen die Prüfsubstanz, gelöst in Ethanol (Endkonzentration 10  $\mu\text{mol/l}$ ), und zu dem anderen Teil die gleiche Menge Ethanol dazugegeben. Nach weiteren 4 h wird das Medium abgesaugt, die Zellen werden mit Trypsinlösung abgelöst und zweimal in 10 ml PBS gewaschen, um die überschüssige markierte Arachidonsäure zu entfernen. Am Schluß werden die Zellen von 5 Schalen jeweils in 2 ml PBS suspendiert (ca.  $2 \times 10^6$  Zellen/ml).

#### **2.11.2.6 Inkubation und Extraktion**

Die Arachidonsäurefreisetzung wird durch Zugabe von 20  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$ , gelöst in PBS (200 mmol/l, Endkonzentration 2 mmol/l), und 10  $\mu\text{l}$  Kalziumionophor A 23587 gelöst in Ethanol (1,2 mmol/l, Endkonzentration 6  $\mu\text{mol/l}$ ) gestartet. Alternativ zum Kalziumionophor A23587 wird PAF bei gleicher Konzentration verwendet.

Nach 15 min wird die Inkubation durch Zugabe von 0,525 ml 1 %ige Ameisensäure gestoppt; die Reaktionsprodukte werden nacheinander mit 5 ml Chloroform/Methanol (1:1) und 2 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden am Rota-

tionsverdampfer eingedampft, der Rückstand im Laufmittel (60 µl) gelöst und direkt in das HPLC-System injiziert.

#### **2.11.2.7 HPLC-Analyse**

HPLC-System: Hewlett Packard 1084 B

Säule: Lichrosorb RP18, 10 µm, 250 mm x 4 mm (Merck, Darmstadt)

Laufmittel: Laufmittel A: Acetonitril/Wasser/Phosphorsäure (300:700:0,2, v/v);  
Laufmittel B: Acetonitril/Phosphorsäure (1000: 0,2, v/v);  
Von 0 - 15 min beträgt der Anteil von Laufmittel B 10 %; von 15 - 25 min steigt der Anteil von Laufmittel B in einem linearen Gradienten von 10 % auf 95 %

Flußrate: 1,5 ml/min

Radioaktivitätsmonitor: LB 505, Berthold, Wildbad

#### **2.11.2.8 Auswertung**

Die freigesetzte Arachidonsäure (Summe aus <sup>14</sup>C-Arachidonsäure und <sup>14</sup>C-6-Keto-PGF1α) wird auf eine Kontrollinkubation mit 20 µl PBS und 10 µl Ethanol ohne CaCl<sub>2</sub> und Kalziumionophor bezogen. Die Wirkung einer Substanz wird einmal nach 6 h, Vorinkubation zum anderen nach 5 min Vorinkubation von 10 µl Prüfsubstanz, gelöst in Ethanol (Endkonzentration 10 µmol/l), bestimmt.

#### **2.11.3 Ergebnisse und Diskussion**

Dieses Testsystem wurde primär als "second stage"-Modell zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Substanzen mit antiinflammatorischer Aktivität etabliert, kann jedoch auch für das Substanzscreening verwendet werden. Da in unserer Forschung keine antiphlogistischen Substanzen entwickelt wurden, deren Wirkung dieser Mechanismus zugrunde liegt, wurde dieses Testsystem nicht zum Grundscreening eingesetzt. Nach der Validierung mit Referenzsubstanzen (Tab. 2.27) wurde dieser

Test für die nähere Charakterisierung von Substanzen verwendet, allerdings konnten keine wirksamen Verbindungen gefunden werden. Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde sowohl mit PAF als auch mit Kalziumionophor A23187 die Arachidonsäurefreisetzung induziert, da die PAF-induzierte Arachidonsäurefreisetzung auch durch PAF-Antagonisten gehemmt wird. Alle Substanzen wurden sowohl nach 5minütiger als auch 6stündiger Vorinkubation mit der Testsubstanz geprüft, um eine steroidähnliche indirekte Wirkung der Substanzen mitzuerfassen. In Tabelle 2.27 wird deutlich, daß Dexamethason im Gegensatz zu den übrigen Referenzsubstanzen über einen indirekten Mechanismus wirkt, da eine Hemmung der Arachidonsäure-Freisetzung erst nach 6stündiger Vorinkubation stattfindet. Antiinflammatorisch wirkende Steroide wie Dexamethason induzieren die Biosynthese eines Proteins (Lipocortin), das dann die Phospholipase A<sub>2</sub> und somit die Freisetzung der Arachidonsäure aus den Membranen hemmt.

*Tab. 2.27: Hemmung der Arachidonsäure-Freisetzung aus Ratten-Endothelzellen.*

SUBSTANZ	<u>Inhibition des Arachidonsäure-Sekretion [%]</u>	
	6 h Vorinkubations- zeit	5 min Vorinkubations- zeit
Dexamethason <sup>a</sup>	65	0
Chloroquin <sup>a</sup>	2	32
Mepacrin <sup>a</sup>	5	38
Aristolochiasäure <sup>b</sup>	10	45

<sup>a</sup> bei einer Konzentration von 10 µmol/l

<sup>b</sup> bei einer Konzentration von 100 µmol/l

## ***2.12 Inhibition des 5-Lipoxygenase-Weges in Granulozyten***

### ***2.12.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit***

Nach Inkubation von Schweinegranulozyten-Homogenaten mit  $^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure werden die radioaktiv markierten Oxidationsprodukte aus dem Reaktionsansatz extrahiert, mittels der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) getrennt und mit Hilfe eines UV- bzw. Radiodetektors quantifiziert. Die Arachidonsäure wird in Schweinegranulozyten hauptsächlich über die 5-Lipoxygenase zu 5-HETE und Leukotrien  $\text{B}_4$  ( $\text{LTB}_4$ ) oxidiert.  $\text{LTB}_4$  hat in vitro eine enorme chemotaktische Wirkung auf Leukozyten und spielt wahrscheinlich eine besondere, im Detail noch nicht geklärte Rolle bei Entzündung und allergischen Reaktionen.

### ***2.12.2 Material und Methoden***

#### ***2.12.2.1 Reagenzien***

Als Substrate werden  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure (spez. Aktivität: 54,5 Ci/mol) von NEN (Dreieich), Arachidonsäure (99 % rein) und zur Hemmung der 12-Lipoxygenase 5,8,11,14-Eicosatetraensäure von Hoffmann LaRoche (Grenzach-Wyhlen) verwendet. Alle weiteren benutzten Chemikalien sollten p.a.-Qualität haben.

Die zu untersuchenden Prüfsubstanzen werden in Ethanol oder Phosphat-Puffer (Lösung 5) gelöst (Stammlösung 2 mmol/l) und bei einer Endkonzentration von 20  $\mu\text{mol/l}$  geprüft.

#### ***2.12.2.2 Herstellung der Rattenplasmaextrakte***

Bei der Ex-vivo-Prüfung werden Plasma-Extrakte von mit der Prüfsubstanz behandelten Ratten eingesetzt. Männliche Wistar-Ratten werden über Nacht nüchtern gesetzt. Die Substanzen werden in Tylose-Suspension per Schlundsonde oral verabreicht. Das Blut (5 ml) wird nach 3 h aus der Vena cava entnommen und sofort mit 0,5 ml Liquemin-Lösung versetzt. Dann wird das Blut bei  $6.000 \times g$  10 min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Plasma (ca. 3 ml) wird von den sedimentierten Blutzellen getrennt, 1,5 ml davon mit 0,5 ml Lösung 4 verdünnt und über eine C18 Bond-Elut Säule (ict Handelsge-

sellschaft, Frankfurt) gegeben. Die Säule wird vorher mit 2 ml Methanol und 2 ml destilliertem Wasser vorbehandelt. Das Eluat wird aufgefangen (Volumen 1). Die Säule wird dann mit 3 ml destilliertem Wasser gewaschen, und danach werden die Produkte mit 2 ml Methanol eluiert (Volumen 2). Volumen 1 wird mit 300 µl HCl (1 mol/l) angesäuert und über eine Säule gegeben, welche mit 2 ml Methanol und 2 ml saurem Wasser (pH 2,0) vorbehandelt wurde. Die Säule wird mit 6 ml saurem Wasser gewaschen, die Produkte werden mit 6 ml Methanol extrahiert (Volumen 3). Volumen 2 und Volumen 3 werden gepoolt und eingedampft, der Rückstand wird in 25 µl Ethanol gelöst und anstelle der Testsubstanz in vitro auf Hemmung der Enzyme des 5-Lipoxygenaseweges geprüft (siehe 2.12.2.5.). Abbildung 2.25 zeigt schematisch die Methode zur Gewinnung dieser Plasmaextrakte.

### **2.12.2.3 Puffer und Lösungen**

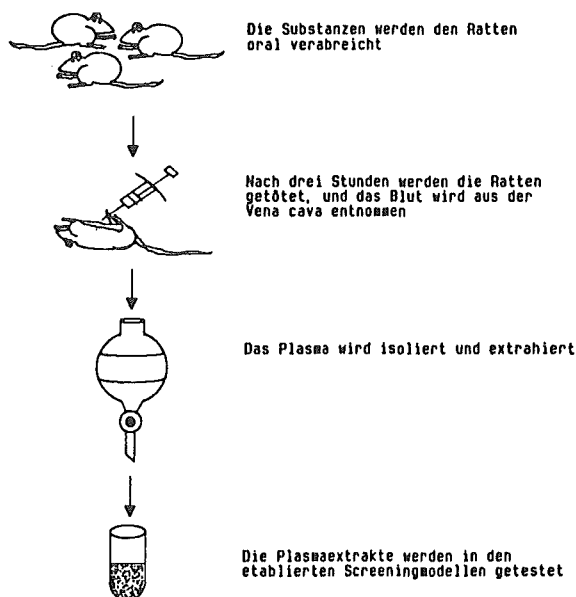
1. NaCl-Lösung (0,95 % w/w) mit 3,8 % (w/w) Na-Citrat und Liquemin (50.000 Units/l, Hoffmann-LaRoche, Grenzach-Wyhlen)
2. NaCl-Lösung (0,95 %, w/w) mit 6 % (w/w) Dextran T-500 (Pharmacia, Freiburg)
3. HBSS-Puffer (Tris/HCl, 14,5 mmol/l, pH 7,6; 0,1 % w/w wasserfreie D-Glucose; 5 µmol/l  $\text{CaCl}_2$ ; 98 µmol/l  $\text{MgCl}_2$ ; 0,54 mmol/l KCl; 0,14 mol/l NaCl) mit 0,38 % (w/w) Na-Citrat
4. Tris/HCl-Puffer (17 mmol/l, pH 7,2) mit 0,17 % (w/w)  $\text{NH}_4\text{Cl}$
5. Phosphat-Puffer (10 mmol/l, pH 7,4) mit 0,95 % (w/w) NaCl

### **2.12.2.4 Isolierung der Schweinegranulozyten**

Das Schweineblut zur Isolierung der Granulozyten wird frisch geschlachteten Hausschweinen auf dem Schlachthof entnommen. Das Blut (1,8 l) wird in einem 2-l-Kunststoffgefäß aufgefangen und mit 200 ml Lösung 1 vermischt. Zur nachfolgenden Sedimentation der Erythrozyten wird das Blut (2 l) innerhalb 1 h in einem Kunststoff-Meßzylinder zu 400 ml Lösung 2 gegeben. Die Sedimentation und alle weiteren Schritte der Zell-



isolierung erfolgen bei Zimmertemperatur. Nach 1 h Sedimentationsdauer wird der Überstand vorsichtig von den sedimentierten Erythrozyten getrennt und 10 min bei 500 x g zentrifugiert. Nach der ersten Zentrifugation befindet sich der größte Teil der Thrombozyten im Überstand. Das Sediment enthält Granulozyten, wenige Monozyten und die restlichen Erythrozyten. Der Überstand wird verworfen, das Pellet vorsichtig in Lösung 3 suspendiert und erneut zentrifugiert. Danach erfolgt die Lysis der restlichen Erythrozyten durch osmotischen Schock in 200 ml Lösung 4 (Inkubationsdauer: 5 min). Nach einer erneuten Zentrifugation werden die Zellen in Lösung 2 suspendiert, zentrifugiert und noch zweimal mit Lösung 5 gewaschen. Der Zelltitert wird mit Hilfe eines Coulter Counter (Coulter Electronics Ltd., Harpenden Herts, England) bestimmt und mit Lösung 5 auf  $1 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt. Mit Hilfe der Trypanblau-Vitalfärbung (1,8 ml Trypanblau-Lösung, Boehringer, Mannheim, + 3,0 ml Lösung 6 + 0,2 ml Zellsuspension) wird die Vitalität der Zellen überprüft (Thoma-Zählkammer, Brand, Wertheim). Der prozentuale Anteil vitaler Zellen sollte größer als 95 % sein.



**Abb. 2.25: Schematische Darstellung der Arbeitsgänge zur Isolierung von Plasmaextrakten aus Ratten, denen Prüfsubstanzen verabreicht worden waren.**

### 2.12.2.5 Inkubation und Extraktion

Vor der Inkubation werden die Granulozyten ultrabeschallt (Branson Sonifier, 1 min, 40 W, 4 °C). 500 µl Granulozyten-Homogenat werden dann mit Lösung 5 auf 2,355 ml aufgefüllt und erwärmt (25 °C).  $\text{CaCl}_2$  und ATP werden in 25 µl bzw. 50 µl Lösung 5 dazugegeben (Endkonzentration 2 mmol/l). 25 µl der Substanzstammlösung oder eines Plasmaextraktes und 25 µl 5,8,11,14-Eicosatetrainsäure (ETYA, gelöst in Ethanol, Endkonzentration 4 µmol/l) werden 3 min bei 25 °C mit den Granulozyten vorinkubiert. Die Inkubation (5 min, 37 °C) wird durch Zugabe von 20 µl  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure (54,5 Ci/mol, insgesamt 0,2 µCi) in Ethanol gestartet. Die Endkonzentration an Ethanol sollte nie größer als 4 % bei einem Inkubationsvolumen von 2,5 ml sein.

Zur Inkubation von ganzen Zellen wird nach Zugabe von 25 µl  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (Endkonzentration 2 mmol/l) die Granulozyten-Suspension (2,425 ml) auf 25 °C erwärmt. Der Inhibitor (in 25 µl Lösung 5 oder Ethanol, Endkonzentration 100 µmol/l) und 25 µl 5,8,11,14-Eicosatetrainsäure (ETYA gelöst in Ethanol, Endkonzentration 4 µmol/l) wird 3 min bei 25 °C mit den Granulozyten vorinkubiert. Die Inkubation (5 min, 37 °C) wird durch Zugabe von 10 µl Arachidonsäure in Tris-Puffer (0,2 mol/l, pH 9,5), 10 µl ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ )-Arachidonsäure (54,5 Ci/mol, insgesamt 0,1 µCi) in Ethanol und 5 µl Calcium-Ionophor A23187 in Ethanol gestartet. Die Endkonzentrationen betragen 50 µmol/l für die Arachidonsäure und 6 µmol/l für das Calcium-Ionophor A23187. Die Endkonzentration an Ethanol sollte 4 % nicht übersteigen bei einem Inkubationsvolumen von 2,5 ml.

Die Inkubationen werden durch Zugabe von 0,525 ml 1 %ige Ameisensäure gestoppt; die Reaktionsprodukte werden nacheinander mit 5 ml Chloroform/Methanol (1:1) und 2 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden am Rotationsverdampfer eingedampft, der Rückstand im Laufmittel (60 µl) gelöst und direkt in das HPLC-System injiziert.

#### 2.12.2.6 HPLC-Analyse

HPLC-System: Hewlett Packard 1084 B

Säule: Lichrosorb 60, 7  $\mu$ m, 250 mm x 4 mm (Merck, Darmstadt)

Laufmittel: Laufmittel A: n-Hexan/Methanol/2-Propanol (972:18:10, v/v);  
Laufmittel B: n-Hexan/Methanol/2-Propanol (972:18:70, v/v); die Laufmittel enthalten 0,1 % Essigsäure und 0,02 % Wasser;

Von 0-12 min beträgt der Anteil von Laufmittel B 15 %; von 12-27 min stieg der Anteil von Laufmittel B in einem linearen Gradienten von 15 % auf 95 %.

Flußrate: 2 ml/min

Radioaktivitätsmonitor: LB 505, Berthold, Wildbad

#### 2.12.2.7 Auswertung

Mit Hilfe der hier verwendeten HPLC-Analyse können die radioaktiv markierten Produkte 5-HETE, LTB<sub>4</sub> und LTB<sub>4</sub>-Isomere getrennt und quantitativ erfaßt werden. Die Summe der Peakflächen dieser Produkte bezogen auf die Gesamtradioaktivität repräsentieren die Aktivität des Enzyms 5-Lipoxygenase. Wird die 5-Lipoxygenase nicht beeinflußt, so kann eine LTA<sub>4</sub>-Hydrolase-Hemmung durch die Verminderung der LTB<sub>4</sub>-Produktion zugunsten der durch nicht-enzymatische Hydrolyse aus LTA<sub>4</sub> entstehenden LTB<sub>4</sub>-Isomere gemessen werden.

#### 2.12.3 Ergebnisse und Diskussion

Dieses Testsystem dient der Auffindung von 5-Lipoxygenase- bzw. LTA<sub>4</sub>-Hydrolase-Inhibitoren. Abbildung 2.26 zeigt die Chromatogramme aus einer Screeninguntersuchung mit RP 62380. Das Kontrollchromatogramm zeigt, daß die Arachidonsäure von den Zellen zu 5-HETE, LTB<sub>4</sub> und geringen Mengen von LTB<sub>4</sub>-6-trans-Isomeren verstoffwechselt wird. Alle diese Produkte lassen sich mit dem entwickelten HPLC-System problemlos tren-

nen. RP 62380, als Beispiel einer Substanz mit selektiven LTA<sub>4</sub>-Hydrolase-hemmenden Eigenschaften, bewirkt eine Hemmung der vom LTA<sub>4</sub> ausgehenden Biosynthese des LTB<sub>4</sub> zugunsten der nicht-enzymatisch aus LTA<sub>4</sub> entstehenden LTB<sub>4</sub>-6-trans-Isomere.

Im Umfeld von NAT 04-159, einem selektiven, aber recht schwachen Inhibitor der LTA<sub>4</sub>-Hydrolase (Kuhl et al., 1986b), wurde versucht, in vitro auf LTA<sub>4</sub>-Hydrolase-hemmende Eigenschaften hin zu optimieren. Die Bilanz der durchgeführten Untersuchungen sieht folgendermaßen aus: Insgesamt wurden von dieser Substanzgruppe 211 Substanzen in vitro bei 20 µmol/l untersucht. Für die 21 Verbindungen, die die LTB<sub>4</sub>-Biosynthese wie RP 63280 zu mehr als 70 % hemmten, wurde der IC<sub>50</sub>-Wert bestimmt. Neun Substanzen mit IC<sub>50</sub>-Werten unter 8 µmol/l wurden ex vivo untersucht. Die 3 Substanzen mit erfolgversprechender Ex-vivo-Wirksamkeit wurden dann im Tierversuch auf ihre In-vivo-Wirksamkeit geprüft. Tabelle 2.28 zeigt die IC<sub>50</sub>-Werte der 21 bisher besten Substanzen aus dieser Substanzgruppe. Zusätzlich sind die Ex-vivo- und die In-vivo-Wirkungen - soweit sie bestimmt wurden - für diese "In-vitro-Spitzenreiter" angegeben. Tabelle 2.28 zeigt, daß die in vitro aktivsten Substanzen auch Ex-vivo-Wirksamkeit besitzen, während sie in dem verwendeten Entzündungsmodell nur eine moderate Wirksamkeit zeigten. Bei dem von uns zum Nachweis der in vivo entzündungshemmenden Wirkung herangezogenen In-vivo-Modell (Cobra-Venom-Faktor(CVF)-induziertes Rattenpfortenödem) dürfte LTB<sub>4</sub> nur zum Teil für die Ausbildung der Entzündungssymptome verantwortlich sein. Das erklärt, warum auch bei einer mutmaßlich vollständigen Hemmung der LTB<sub>4</sub>-Biosynthese in vivo nur eine teilweise Hemmung der Ödembildung erreicht werden konnte.

Das Screening dieser Substanzgruppe macht jedoch deutlich, wie ein vorgeschaltetes In-vitro-Screening die Zahl der Tierversuche auf ein notwendiges Minimum einschränken kann und noch zusätzlich den Aufwand an Kosten und Zeit zum Auffinden einer geeigneten Entwicklungssubstanz reduzieren hilft.

Bei Ebselen und Ebselen-ähnlichen Substanzen handelt es sich um Verbindungen mit 5-HETE und LTB<sub>4</sub>-isomerisierenden Eigenschaften (Kuhl et al., 1986b). Abbildung 2.27 zeigt HPLC-Chromatogramme, welche die Wirkung von Ebselen bei einer Kon-

zentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  auf die Produkte des 5-Lipoxygenase-Stoffwechselweges deutlich machen. Bei dieser Konzentration wird die Bildung von 5-Lipoxygenase-Produkten insgesamt nur schwach gehemmt. Dagegen werden die biologisch aktiven Produkte 5-HETE und  $\text{LTB}_4$  zu den biologisch inaktiven trans-Isomeren isomerisiert. Abbildung 2.28 zeigt die dosisabhängige Umwandlung von  $\text{LTB}_4$  in eines der normalerweise durch nicht-enzymatische Hydrolyse aus  $\text{LTA}_4$  entstehenden  $\text{LTB}_4$ -6-trans-Isomeren.

Tab. 2.28: Vergleich der Wirkungen von Prüfsubstanzen auf die  $\text{LTA}_4$ -Hydrolase-Aktivität *in vitro* mit den Wirkungen von Plasmaextrakten behandelter Ratten und den Effekten im CVF-induzierten Rattenpfotenödem. Experimentelle Details siehe: 2.12.2.2 - 2.12.2.7.

Substanz	$\text{LTA}_4$ -Hydrolase	$\text{LTA}_4$ -Hydrolase			CVF-induziertes Pfoten- ödem Ratte p.o.
	<i>in vitro</i>	<i>ex vivo</i>			<i>in vivo</i>
	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	100	30	5	100 [mg/kg] p.o.
		[mg/kg]			
RP 65316	0,9	-31	-15	-29	n.b.
RP 63951	1,5	-80	-69	-27	-35
RP 64966A	1,5	-73	-54	-39	- 8
RP 62380	2,9	-82	-44	0	-10
RP 64485A	2,8	-19	-19	- 4	n.b.
RP 63986	3,4	0	0	0	n.b.
RP 64122	5,0	-27	-24	- 2	n.b.
RP 62392	6,2	-13	-2	0	n.b.
RP 64779	7,2	- 7	0	-22	n.b.
RP 62575	3,0		n.b.		n.b.
RP 62394A	3,5		n.b.		n.b.
RP 64496	6,3		n.b.		n.b.
RP 65194A	6,2		n.b.		n.b.
RP 63950	7,0		n.b.		n.b.
RP 64963	7,8		n.b.		n.b.
RP 65206	9,7		n.b.		n.b.
RP 64720	9,1		n.b.		n.b.
RP 64964	9,2		n.b.		n.b.
RP 64497	9,6		n.b.		n.b.
RP 63985	10,0		n.b.		n.b.
RP 62393A	15,0		n.b.		n.b.

n.b. = nicht bestimmt

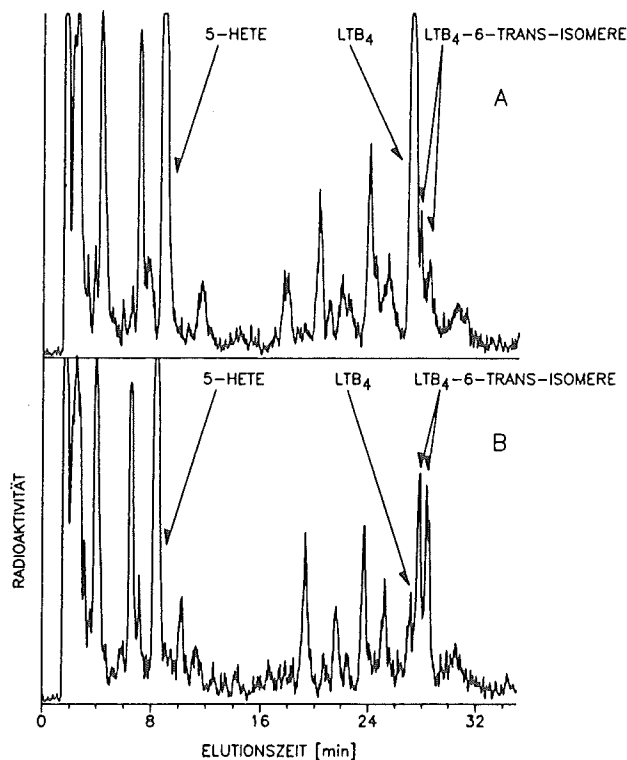


Abb. 2.26: Hemmung der LTA<sub>4</sub>-Hydrolase aus Schweinegranulozyten durch RP 63280: SP-HPLC-Trennung der Produkte einer 5minütigen Inkubation von Schweinegranulozyten-Homogenat mit <sup>14</sup>C-Arachidonsäure in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 20 μmol/l RP 62380. Die einzelnen Arachidonsäure-Metabolite wurden durch Cochromatographie nicht markierter Standard-Substanzen identifiziert.

Abbildung 2.29 zeigt den Versuch, von 42 der insgesamt 935 geprüften Verbindungen die In-vitro-Wirkungen mit den Effekten im Cobra-Venom-Faktor-induzierten Rattenpfotenödem zu korrelieren. Der Grund für die fehlende Korrelation zwischen In-vitro- und In-vivo-Ergebnissen für diese Substanzklasse ist in der vollständigen Metabolisierung der Substanzen nach oraler Applikation zu suchen, wie nachfolgende Metabolisierungsstudien belegten. Diese Untersuchung zeigt, daß ein In-vitro-Screening von Substanzen, welche metabolisch nicht stabil sind, keine Aussage über die potentielle In-vivo-Wirksamkeit liefern kann.

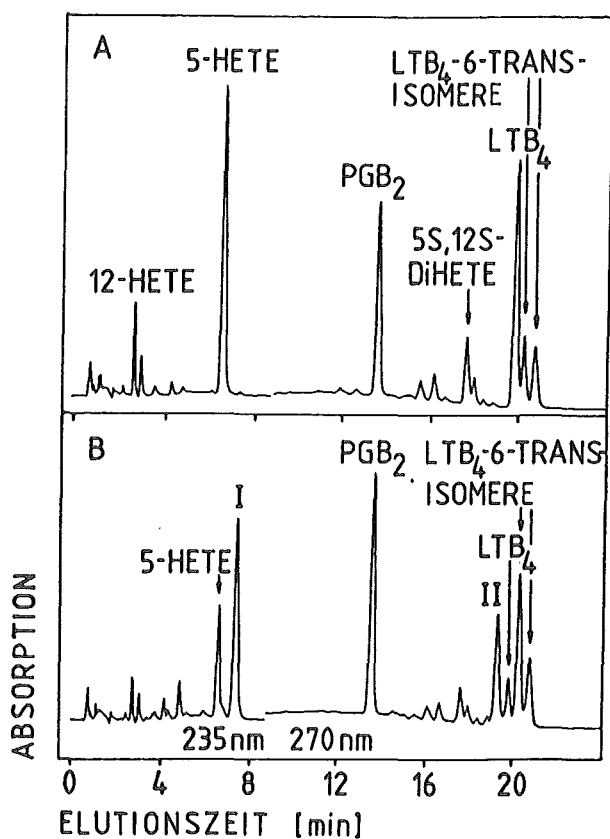


Abb. 2.27: Hemmung der  $LTB_4$ -Bildung in Schweinegranulozyten durch Ebselen  
 SP-HPLC-Trennung der Produkte nach 5minütiger Inkubation von Schweinegranulozyten (siehe 2.12.2.5) in Abwesenheit (A) und in Anwesenheit (B) von Ebselen ( $10 \mu\text{mol/l}$ ). Die verschiedenen Arachidonsäure-Metabolite wurden mit Hilfe von GC-MS und NMR identifiziert. Bei der mit I bezeichneten Verbindung handelt es sich um das 8-trans-Isomer von 5-HETE.

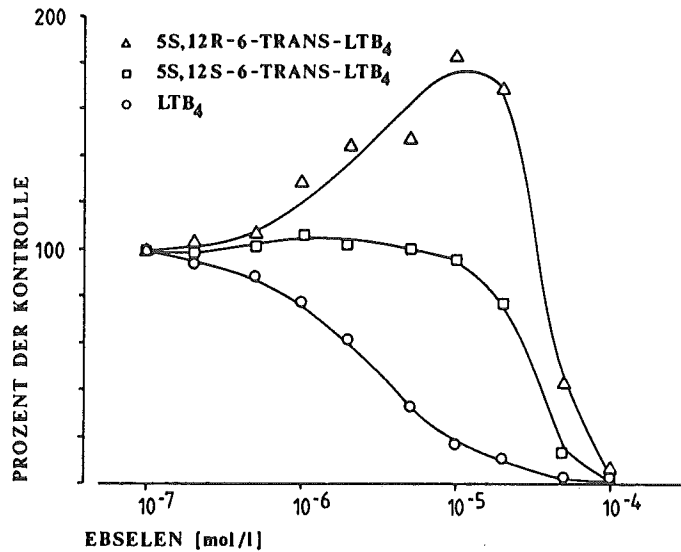


Abb. 2.28: Dosisabhängige Wirkung von Ebselen auf die Bildung von  $LTB_4$ , 5S,12R-6-trans- $LTB_4$  und 5S,12S-6-trans- $LTB_4$ . Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis von mindestens 2 unabhängigen Einzelerperimenten.

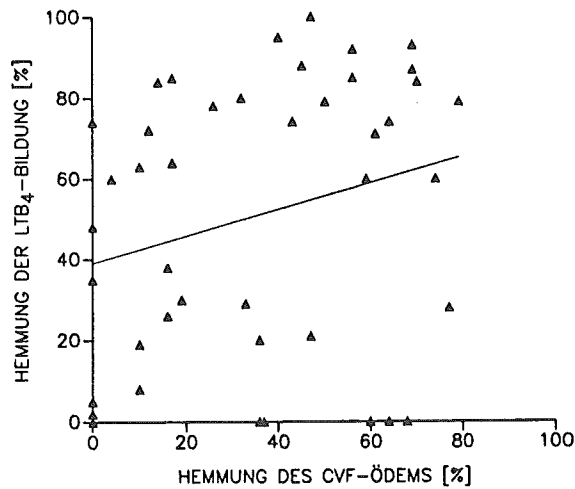


Abb. 2.29: Korrelation der Hemmung des CVF-induzierten Rat-tenpfotenödems mit der Hemmung der  $LTB_4$ -Bildung in Schweinegranulozyten durch Ebselen und 42 weitere Substanzen aus dem Ebselen-Umfeld. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,251 ( $n=41$ ).



## *2.13 Inhibition des Cyclooxygenase-Weges*

### *2.13.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit*

Der Cyclooxygenase-Weg führt unter Katalyse durch die Cyclooxygenase zu dem zyklischen Endoperoxid  $\text{PGG}_2$ , daß in einem zweiten, ebenfalls durch die Cyclooxygenase katalysierten Schritt zu  $\text{PGH}_2$  reduziert wird. Von  $\text{PGH}_2$  an verzweigt sich der Cyclooxygenase-Weg und führt zu einer Reihe von unterschiedlichen Produkten mit z.T. antagonistischen Wirkspektren. So stimuliert das  $\text{PGI}_2$ , das durch die Prostacyclin-Synthetase in Endothelzellen aus  $\text{PGH}_2$  gebildet wird, die Auflösung von Thrombozytenaggregaten und wirkt somit dem Thromboxan ( $\text{TXA}_2$ ) entgegen, das durch die katalytische Wirkung der Thromboxan-Synthetase in Thrombozyten aus  $\text{PGH}_2$  entsteht.

Nach Inkubation von Humanthrombozyten mit  $^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure werden die radioaktiv markierten Oxidationsprodukte aus dem Reaktionsansatz extrahiert, dünnschichtchromatographisch getrennt und mit Hilfe des Dünnschichtscanners quantifiziert. Die Cyclooxygenase in Humanthrombozyten oxidiert die Arachidonsäure hauptsächlich zu Thromboxan  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) und 12-Hydroxyheptadecatriensäure (HHT). Thromboxan  $\text{A}_2$  ist in wäßrigen Lösungen nicht stabil und kann daher nur über das stabile Zerfallsprodukt Thromboxan  $\text{B}_2$  analysiert werden. Thromboxan  $\text{A}_2$  hat in vitro eine enorme aggregationsauslösende Wirkung auf Thrombozyten wirkt blutdruckerhöhend und spielt wahrscheinlich zusammen mit seinem Gegenspieler Prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ ) eine besondere, im Detail noch nicht geklärte Rolle bei Thrombose und Atherosklerose.

Nach Inkubation von Hammelsamenblasen-Mikrosomen in Gegenwart von  $^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure lassen sich nach Trennung der Reaktionsprodukte über ein RP-HPLC-System mit Hilfe eines Radiodetektors die Cyclooxygenase-Produkte  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  nachweisen. Alle diese Verbindungen sind potente Vermittler von inter- und intrazellulären Signalen, die eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Reaktionen auslösen können und eine besondere Bedeutung bei Entzündungen und thromboembolischen Prozessen haben.

## **2.13.2 Material und Methoden**

### **2.13.2.1 Reagenzien**

Als Substrat wird 1-<sup>14</sup>C-Arachidonsäure (spez. Akt. 54,5 Ci/mol) von New England Nuclear (Dreieich) verwendet.

Alle weiteren benutzten Chemikalien sollen p.a.-Qualität haben.

Die Substanzen wurden in Ethanol oder Phosphat-Puffer gelöst (Stammlösung 10 mmol/l) und bei einer Endkonzentration von 100 µmol/l geprüft.

Als Referenzsubstanzen werden NAT 01-499, BW 755C, BW 540C, Ebselen, Indometacin, und Octimibat eingesetzt.

### **2.13.2.2 Puffer und Lösungen**

1. Tris/HCl-Puffer (12 mmol/l, pH 5,6) mit 1,5 mmol/l Ethylenglycol-bis-( $\alpha$ -amino-ethyl-ether) N,N'-tetraessigsäure (EGTA), 0,14 mmol/l NaCl und 5 mmol/l Glucose
2. Phosphat-Puffer (10 mmol/l, pH 7,4) mit 0,95 % (w/w) NaCl
3. EGTA-Lösung (90 mmol/l) mit 60 mmol/l NaCl

### **2.13.2.3 Isolierung von Humanthrombozyten**

Humanblut (90 ml) wird nüchternen Probanden, die seit mindestens einer Woche medikamentenfrei sind, aus der Armvene entnommen und im Verhältnis 9:1 mit Lösung 3 vermischt. Zur Isolation von Humanthrombozyten wird das mit Lösung 3 vermischte Humanblut (100 ml) 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand nochmals bei 650 x g zentrifugiert. Die abzentrifugierten Thrombozyten werden mit Lösung 1 gewaschen und dann vorsichtig in Lösung 2 suspendiert und mit Hilfe des Coulter-Counter auf einen Titer von  $2 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt. Die Thrombozyten können maximal 4 h bis zur Inkubation aufbewahrt werden.

#### **2.13.2.4 Isolierung von Hammelsamenblasen-Mikrosomen**

Die Hammelsamenblasen (ca. 400 g) werden frischgeschlachteten männlichen Schafen auf dem Schlachthof der Fa. Kind in Grevenbroich entnommen, gesäubert und in 3 Volumen  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (0,1 mol/l, pH 7,4) in Gegenwart von 1 mmol/l EDTA homogenisiert (Ultra Turrax, Janke und Kunkel, Staufen). Nach Zentrifugation bei  $4.000 \times g$  (4 °C, 15 min) wird der Überstand nochmals bei  $100.000 \times g$  (4 °C, 1 h) zentrifugiert. Das Pellet wird in 50 ml bidest. Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet (Ausbeute: 15 g, Trockengewicht). Die lyophilisierten Mikrosomen werden in Portionen zu 1 g bei -40 °C aufbewahrt.

#### **2.13.2.5 Inkubationen und Extraktionen**

Zur Inkubation der Humanthrombozyten wird 1,95 ml der Thrombozyten-Suspension auf 25 °C erwärmt. Nach Zugabe von 20 µl  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (Endkonzentration 2 mmol/l) und des Inhibitors (20 µl in Lösung 6 oder Ethanol) wird 3 min bei 25 °C vorinkubiert. Die Inkubation (5 min, 37 °C) wird durch Zugabe von 10 µl  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure (54,5 Ci/mol, insgesamt 0,1 µCi) in Ethanol gestartet. Die Konzentration der  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure im Versuchsansatz beträgt 0,9 µmol/l. Die Ethanol-Endkonzentration ist kleiner als 2 %, das Inkubationsvolumen beträgt 2 ml.

20 mg der gefriergetrockneten Hammelsamenblasen-Mikrosomen werden in 1 ml Tris/HCl-Puffer (0,2 mol/l, pH 8,0) gelöst, und 100 µl dieser Lösung werden mit 1,81 ml Tris/HCl-Puffer und 20 µl Inhibitor-Lösung (in Tris/HCl-Puffer oder Ethanol) bei 25 °C 3 min vorinkubiert. Dann werden reduziertes Glutathion (20 µl), EDTA (20 µl) und Adrenalin (20 µl), jeweils in Tris/HCl-Puffer gelöst, dazugegeben. Die Endkonzentrationen betragen 1 mmol/l, 0,05 mmol/l bzw. 1 mmol/l. Die Inkubation (10 min, 37 °C) wird mit 10 µl  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure (in Ethanol, 54,5 Ci/mol, insgesamt 0,1 µCi) gestartet. Die Konzentration der  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure im Versuchsansatz beträgt 0,9 µmol/l. Die Endkonzentration des Ethanols ist kleiner als 2 % und das Inkubationsvolumen beträgt 2 ml.

Die Inkubationen werden durch Zugabe von 0,5 ml 1 %ige Ameisensäure gestoppt; die Reaktionsprodukte werden nacheinander mit 5 ml Chloroform/Methanol (1:1) und 2 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden gepoolt und am Rotationsverdampfer eingedampft. Zur dünnschichtchromatographischen Analyse wird der Rückstand in 100 µl eines Diethylether/Methanol-Gemisches (70:30, vol/vol) gelöst. Zur HPLC-Analyse wird der Rückstand in 90 µl eines Methanol/Wasser-Gemisches (2:1, v/v) gelöst und in den HPLC injiziert.

#### **2.13.2.6 Dünnschichtchromatographie**

Der gelöste Rückstand wird auf Dünnschichtplatten (Kieselgel 60 mit Konzentrierungszone (Merck, Darmstadt)) aufgetragen. Das zur Entwicklung der Dünnschichtplatten verwendete Laufmittelgemisch besteht aus Chloroform/Methanol/Wasser/Essigsäure im Verhältnis 90:8:0,8:1 (vol/vol). Die quantitative Analyse der radioaktiven Produkte wird mit Hilfe des Dünnschichtscanners LB 284 (Berthold, Wildbad) durchgeführt.

#### **2.13.2.7 HPLC-Analyse**

HPLC-System: Hewlett Packard 1084 B

Säule: Lichrosorb RP18, 10 µm, 250 mm x 4 mm (Merck, Darmstadt)

Laufmittel: Laufmittel A: Acetonitril/Wasser/Phosphorsäure (300:700:0,2, v/v);

Laufmittel B: Acetonitril/Wasser/Phosphorsäure (700:300:0,2, v/v);

Von 0 - 15 min beträgt der Anteil von Laufmittel B 10 %; von 15-25 min steigt der Anteil von Laufmittel B in einem linearen Gradienten von 10 % auf 95 %

Flußrate: 1,5 ml/min

Radioaktivitätsmonitor: LB 505, Berthold, Wildbad

### 2.13.2.8 Auswertung

Mit Hilfe der hier verwendeten DC- und HPLC-Analyse können 12-HETE und alle entstehenden Cyclooxygenaseprodukte getrennt und quantitativ erfaßt werden. Die 12-HETE-Peakfläche bezogen auf die Gesamtradioaktivität auf der Dünnschichtplatte repräsentiert die Aktivität der 12-Lipoxygenase, die Summe der HHT-, und  $\text{TXB}_2$ -Peakfläche bezogen auf die Gesamtradioaktivität die Aktivität der Cyclooxygenase im Humanthrombozyten-Testsystem. Die Summe der Peakflächen von  $6\text{-PGF}_{1\alpha}$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  bezogen auf die Gesamtradioaktivität im HPLC-Chromatogramm repräsentiert die Aktivität der Cyclooxygenase im Testsystem Hammelsamenblasen-Mikrosomen.

### 2.13.3 Ergebnisse und Diskussion

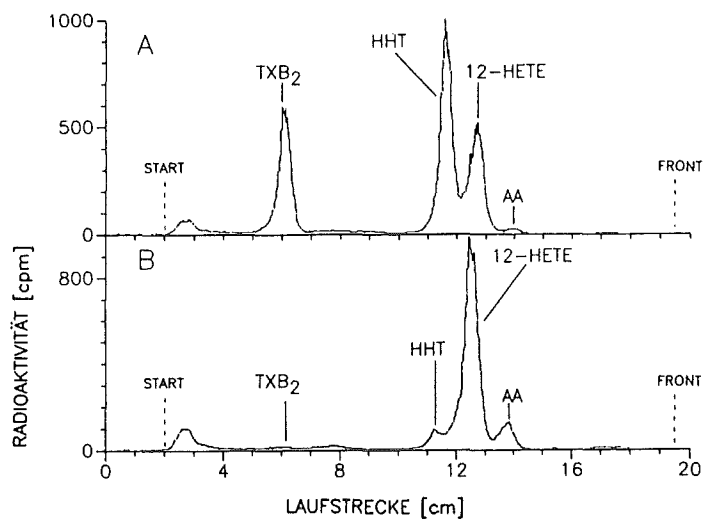
Mit diesen beiden Testsystemen lassen sich die Wirkungen von Substanzen auf die Prostaglandin- und Thromboxan-Biosynthese untersuchen. Zusätzlich läßt sich der Einfluß von Substanzen auf die 12-Lipoxygenase messen. Tabelle 2.29 zeigt die  $\text{IC}_{50}$ -Werte von einigen Referenzsubstanzen für die Cyclooxygenasen aus Humanthrombozyten und Hammelsamenblasen-Mikrosomen und die 12-Lipoxygenase aus Humanthrombozyten in diesen Testmodellen. Interessanterweise hemmen Cyclooxygenase-Inhibitoren die Cyclooxygenase aus Humanthrombozyten um den Faktor 10 stärker als die Hammelsamenblasen-Mikrosomen-Cyclooxygenase. In Abbildung 2.30 sind die Dünnschichtchromatogramme dargestellt, welche nach Inkubation von Human-Thrombozyten in Abwesenheit und Anwesenheit von  $100\text{ }\mu\text{mol/l}$  NAT 04-651, einem selektiven Cyclooxygenase-Inhibitor, erhalten wurden. In Abbildung 2.31 ist die Wirkung von Polyen-Phosphatidylcholin (PPC, Nattermann, Köln) auf die Prostaglandin-Biosynthese von Hammelsamenblasen-Mikrosomen dargestellt. Diese Substanz hat selektiv Prostacyclin-stimulierende Eigenschaften (Kuhl et al., 1986c).

In unserer Forschung wurde nicht nach selektiven Cyclooxygenase-Inhibitoren gescreent. Auch die Suche nach "dual inhibitors" (Inhibitoren mit Cyclooxygenase- und 5-Lipoxygenase-inhibierender Wirkung) wurde eingestellt. Diese Testsysteme dienten daher als "second stage"-Untersuchungen zum Nachweis der Selektivität von Verbindungen anderer Wirkmechanismen, um

z.B. für die  $LTA_4$ -Hydrolase-Inhibitoren aus dem Umfeld von Evaprofen (Fa. Nattermann) eine Cyclooxygenasehemmung auszuschließen. Eine Hemmung der Cyclooxygenase durch diese Verbindungen hätte die Entscheidung darüber verhindert, ob dieser Effekt oder die Hemmung der  $LTB_4$ -Biosynthese im entzündeten Gewebe für die In-vivo-Wirksamkeit verantwortlich ist. Alle untersuchten Substanzen aus dem Umfeld von Evaprofen zeigten allerdings bei 100  $\mu\text{mol/l}$  keine Hemmung der Cyclooxygenase und 12-Lipoxygenase aus Humanthrombozyten oder der Cyclooxygenase aus Hammelsamenblasen-Mikrosomen.

*Tab. 2.29: Hemmung der Cyclooxygenase (PL-CO) und der 12-Lipoxygenase (12-LO) in menschlichen Thrombozyten und der Cyclooxygenase aus Hammelsamenblasen-Mikrosomen (RSVM-CO) durch Referenz-Substanzen.*

Substanz	IC <sub>50</sub> -Werte [ $\mu\text{mol/l}$ ]		
	PL-CO	12-LO	RSVM-CO
Indometacin	0,1	>1000	1,0
BW 755C	3,3	37	30
BW 540C	2,6	5,8	25
Octimibat	0,08	>1000	0,8



**Abb. 2.30:** Hemmung menschlicher Thrombozyten-Cyclooxygenase durch NAT 04-651: Dünnschicht-Radiochromatogramm der Produkte aus einer 5minütigen Inkubation von menschlichen Thrombozyten in Abwesenheit (A) und in Anwesenheit (B) von 100 μmol/l NAT 04-651 (experimentelle Details: siehe 2.13.2.5 und 2.13.2.6). Die Identität der verschiedenen radioaktiv markierten Arachidonsäure-Metabolite wurde durch Cochromatographie nicht-markierter Referenz-Substanzen bestimmt.

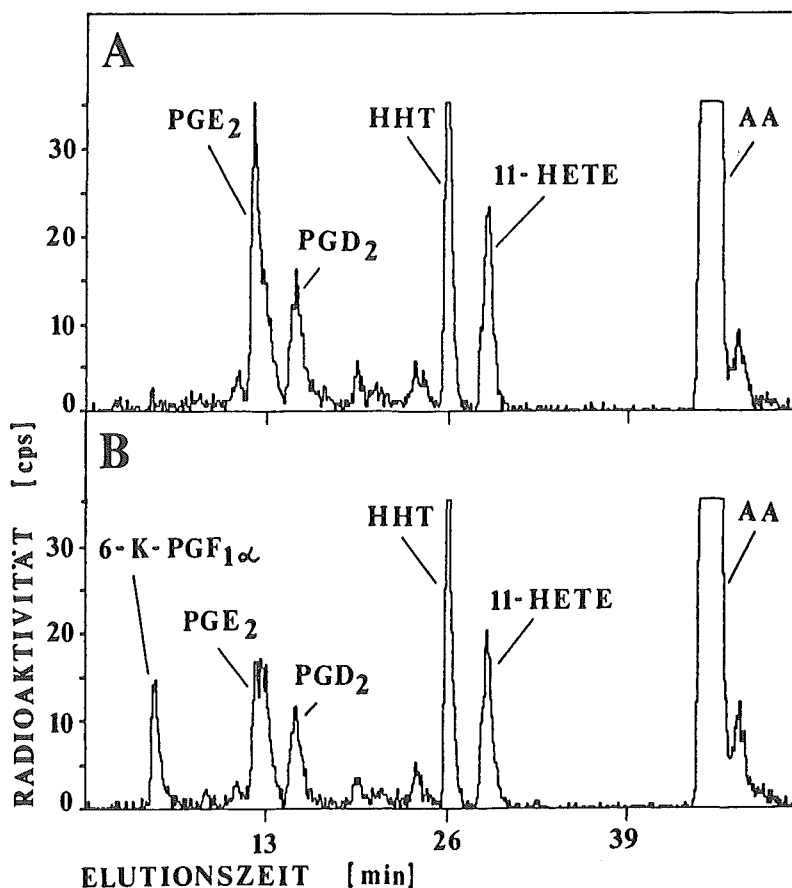


Abb. 2.31: Aktivierung der Prostacyclin-Synthetase aus Hammelsamenblasen-Mikrosomen durch PPC: RP-HPLC-Trennung der Produkte, welche nach 10minütiger Inkubation von Hammelsamenblasen-Mikrosomen in Abwesenheit (A) und in Anwesenheit (B) von 200  $\mu\text{mol/l}$  PPC erhalten wurden (experimentelle Details: siehe 2.13.2.5 und 2.13.2.7). Die Identität der verschiedenen radioaktiv markierten Arachidonsäure-Produkte wurde durch Cochromatographie von unmarkierten authentischen Verbindungen bei einer Wellenlänge von 200 nm bestimmt. 6-Keto-Prostaglandin  $F_{1\alpha}$  (6-K-PGF<sub>1α</sub>) ist das stabile Zerfallsprodukt des instabilen Prostacyclins.



## **2.14 Inhibition des 5-Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-Weges in RBL-1-Zellen**

### **2.14.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Nach Inkubation von RBL-1-Zellen (rat basophilic leukemia cells) mit  $^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure werden die radioaktiv markierten Oxidationsprodukte aus dem Reaktionsansatz extrahiert, mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) getrennt und mit Hilfe eines Radiodetektors quantifiziert. Die 5-Lipoxygenase und Cyclooxygenase in RBL-1-Zellen oxidieren die Arachidonsäure hauptsächlich zu 5-HETE, Leukotrien  $\text{B}_4$  ( $\text{LTB}_4$ ), den  $\text{LTB}_4$ -6-trans-Isomeren und  $\text{PGD}_2$ . In RBL-1-Zellen weisen im Gegensatz zu Schweine- und Humangranulozyten Cyclooxygenase und 5-Lipoxygenase etwa vergleichbare Aktivitäten auf. Daher erlaubt dieses Testsystem, die Beeinflussung des jeweils anderen Stoffwechselweges bei Vorliegen einer selektiven 5-Lipoxygenase- oder Cyclooxygenase-Hemmung zu studieren.

### **2.14.2 Material und Methoden**

#### **2.14.2.1 Reagenzien**

Als Substrate werden  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure (spez. Akt. 54,5 Ci/mol) von NEN (Dreieich), Arachidonsäure (99 % rein) verwendet.

Alle weiteren benutzten Chemikalien sollten p.a.-Qualität haben.

Die zu untersuchenden Prüfsubstanzen werden in Ethanol oder PBS gelöst (Stammlösung 2 mmol/l).

#### **2.14.2.2 Kulturmedien und Lösungen**

1. Minimum Essential Medium, nach Dulbecco (DMEM, Boehringer Mannheim Nr.210048)

DMEM Pulverkonzentrat (für 5 l Medium)

- + 18,5 g  $\text{NaHCO}_3$
- + 0,5 g Streptomycinsulphat
- + 0,3 g Penicillin G (500.000 IU)

wird mit bidest. Wasser auf 5 l auffüllt und nach 15-30minütigem Rühren sterilfiltriert (Filter 0,2 µm, Schleicher & Schüll, Nr.401352).

Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA, 100fach konzentriert, Boehringer Mannheim) werden vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Fötales Kälberserum (FKS, Seromed, verschiedene Chargen) wird zur Inaktivierung von Proteasen zwei Stunden bei 56 °C hitzeinaktiviert und vor Gebrauch 10 % (v/v) dem Flüssigmedium zugefügt.

Als DMEM-Medium wird im folgenden grundsätzlich das Nährmedium einschließlich  $\text{NaHCO}_3$ , NEAA und Antibiotika bezeichnet. Der Zusatz von FKS wird gesondert aufgeführt

2. Phosphate buffered saline (PBS):

8,0 g NaCl

0,2 g KCl

1,15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

werden mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt, der pH-Wert beträgt 7,0.

3. Trypsinlösung

100 ml 0,25 %ige Trypsinlösung (Flow, Nr.1689454) wird mit 7 ml einer 1 %igen EDTA-Lösung (in sterilem PBS-Puffer) versetzt.

*2.14.2.3 Subkultivierung der RBL-1-Zellen*

Alle Arbeitsgänge erfolgen unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank, sterile Verbrauchsware, Pipetten):

- das Medium wird abgesaugt
- 2 ml Trypsinlösung wird zusetzt (NUNC-Petrischalen, d = 10 cm, Nr. 150350)
- Nach 5 min bei 37 °C wird die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, in dem 2 ml DMEM/10 % FKS vorgelegt waren
- es wird bei 2.000 Upm zentrifugiert (Labofuge 6000, Heraeus), 1 min
- der Überstand wird abgesaugt, und das Zellpellet wird in 5 ml DMEM/10 % FKS suspendiert

- die Zentrifugation wird bei gleichen Bedingungen wiederholt
- der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet wird in 5 ml DMEM/10 % FKS aufgenommen und auf fünf neue Petrischalen, die jeweils 10 ml DMEM/10 % FKS enthalten, verteilt
- Um die RBL-1-Zellen einzufrieren, wird das Zellpellet in 1 ml DMEM/10 % FKS/10 % DMSO suspendiert und in eine Ampulle (NUNC, Nr. 363401) pipettiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

#### *2.14.2.4 Inkubation und Extraktion*

Vor der Inkubation der RBL-1-Zellen wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit Trypsinlösung abgelöst und einmal in 10 ml PBS gewaschen, bevor die Zellen von 5 Schalen jeweils in 2,433 ml PBS suspendiert (ca.  $2 \times 10^6$  Zellen/ml) werden.

Zur Inkubation des 5-Lipoxygenaseweges wird nach Zugabe von 25  $\mu$ l  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (Endkonzentration 2 mmol/l) die RBL-1-Zell-Suspension (2,4 ml) auf 37 °C erwärmt. 25  $\mu$ l der Substanzstammlösung oder geeigneter Verdünnungen in PBS oder Ethanol werden 3 min bei 25 °C mit den RBL-1-Zellen vorinkubiert. Die Inkubation (10 min, 37 °C) wird durch Zugabe von 2  $\mu$ l Arachidonsäure in Tris-Puffer (0,2 mol/l, pH 9,5), 10  $\mu$ l  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure (54,5 Ci/mol, insgesamt 0,1  $\mu$ Ci) in Ethanol und 5  $\mu$ l Calcium-Ionophor A23187 in Ethanol gestartet. Die Endkonzentrationen beträgt 10  $\mu$ mol/l für die Arachidonsäure und 6  $\mu$ mol/l für das Calcium-Ionophor A23187. Die Endkonzentration an Ethanol sollte 4 % nicht übersteigen bei einem Inkubationsvolumen von 2,5 ml.

Die Inkubation wird durch Zugabe von 0,525 ml 1 %ige Ameisensäure gestoppt; die Reaktionsprodukte werden nacheinander mit 5 ml Chloroform/Methanol (1:1) und 2 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden am Rotationsverdampfer eingedampft, der Rückstand im Laufmittel (60  $\mu$ l) gelöst und direkt in das HPLC-System injiziert.

### 2.14.2.5 HPLC-Analyse

HPLC-System: Hewlett Packard 1084 B

Säule: Lichrosorb 60, 7 µm, 250 mm x 4 mm (Merck, Darmstadt)

Laufmittel: Laufmittel A: n-Hexan/Methanol/2-Propanol (972:18:10, v/v);

Laufmittel B: n-Hexan/Methanol/2-Propanol (972: 18: 70, v/v); die Laufmittel enthalten 0,1 % Essigsäure und 0,02 % Wasser; Von 0-12 min beträgt der Anteil von Laufmittel B 15 %; von 12-27 min steigt der Anteil von Laufmittel B in einem linearen Gradienten von 15 % auf 95 %

Flußrate: 2 ml/min

Radioaktivitätsmonitor: LB 505, Berthold, Wildbad

### 2.14.2.6 Auswertung

Mit Hilfe der hier verwendeten HPLC-Analyse können 5-HETE, PGD<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> und die LTB<sub>4</sub>-Isomere sauber getrennt und quantitativ erfaßt werden. Die Summe der Peakflächen der Produkte 5-HETE, LTB<sub>4</sub> und LTB<sub>4</sub>-Isomere bezogen auf die Gesamtradioaktivität repräsentieren die Aktivität des Enzyms 5-Lipoxygenase. Wird die 5-Lipoxygenase nicht beeinflußt, so kann eine LTA<sub>4</sub>-Hydrolase-Hemmung durch die Verminderung der LTB<sub>4</sub>-Produktion zugunsten der durch nicht-enzymatische Hydrolyse aus LTA<sub>4</sub> entstehenden LTB<sub>4</sub>-Isomere gemessen werden. Die Peakfläche des PGD<sub>2</sub> bezogen auf die Gesamtradioaktivität repräsentiert die Aktivität der Cyclooxygenase.

### 2.14.3 Ergebnisse und Diskussion

Das Testsystem "Inhibition der 5-Lipoxygenase und Cyclooxygenase in RBL-1-Zellen" wurde entwickelt, weil RBL-1-Zellen die Möglichkeit bieten, in der gleichen Zelle die Wirkung einer Substanz auf 5-Lipoxygenaseweg und Cyclooxygenaseweg zu studieren. Unter den verwendeten Versuchsbedingungen sind

Cyclooxygenase und 5-Lipoxygenase in etwa gleich aktiv. Es wurden Indometacin als selektiver Cyclooxygenase-Hemmstoff, REV 5901 als selektiver 5-Lipoxygenase-Inhibitor und NAT 04-501 als selektiver LTA<sub>4</sub>-Hydrolase-Hemmer jeweils bei einer Konzentration von 10 µmol/l geprüft. Wie in Abb. 2.32, 2.33, 2.34 und Tabelle 2.30 gezeigt wird, führt sowohl die selektive Hemmung der 5-Lipoxygenase durch REV 5901 als auch die selektive Hemmung der Cyclooxygenase durch Indometacin zu einer Aktivierung der Produktbildung im jeweils anderen Stoffwechselweg. Dagegen beeinflußt die Hemmung der LTA<sub>4</sub>-Hydrolase, des unmittelbar an der Biosynthese des Entzündungsmediators LTB<sub>4</sub> beteiligten Enzyms, den Cyclooxygenase-Weg nicht (Abb. 2.34). In vivo sollte man daher mit Hilfe selektiver LTA<sub>4</sub>-Hydrolase-Inhibitoren unerwünschte Substanzwirkungen, die auf der Aktivierung des Cyclooxygenase-Weges beruhen, umgehen können. Daneben machen es solche Substanzen möglich, die Rolle des LTB<sub>4</sub> für das Entzündungsgeschehen isoliert zu untersuchen. Für das Substanzscreening wurde dieses Testsystem nicht eingesetzt.

*Tab. 2.30: Wirkung von REV 5901, Indometacin und NAT 04-501 auf die 5-Lipoxygenase-Aktivität (5-LO), die Cyclooxygenase-Aktivität (CO) und die LTB<sub>4</sub>-Biosynthese (LTB<sub>4</sub>-F) in RBL-1-Zellen.*

Substanz	% Inhibition (-) oder Aktivierung (+) bei 10 µmol/l		
	5-LO	CO	LTB <sub>4</sub> -F
REV 5901	- 90,8	+ 53,8	- 100
Indometacin	+ 55	- 92	+ 15
NAT 04-501	- 3	+ 1	- 96

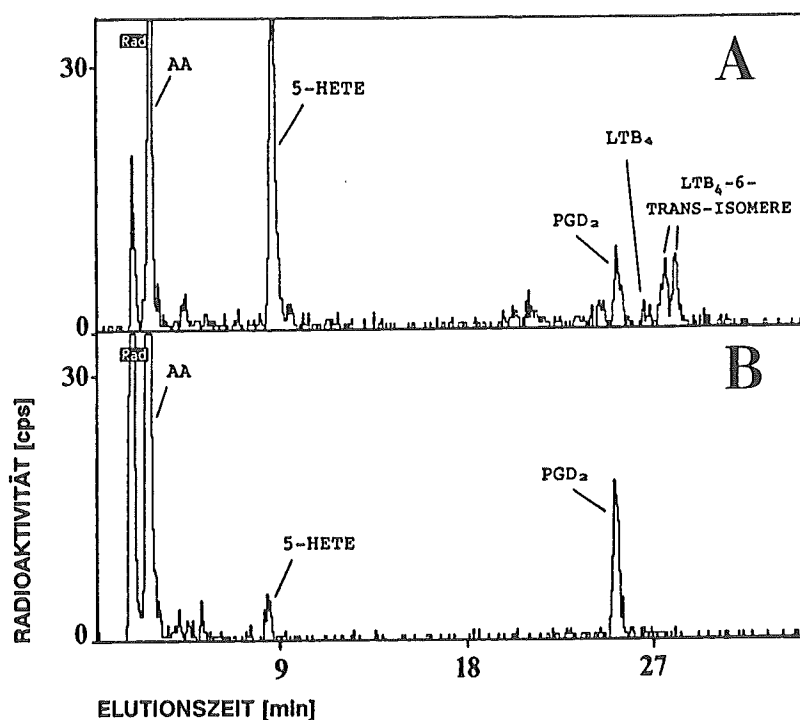


Abb. 2.32: Selektive Hemmung der 5-Lipoxygenase in RBL-1-Zellen durch REV 5901: SP-HPLC-Trennung der Produkte, welche nach 5minütiger Inkubation von RBL-1-Zellen in Abwesenheit (A) und in Anwesenheit (B) von 10  $\mu\text{mol/l}$  REV 5901 erhalten wurden (experimentelle Details; siehe 2.14.2.4 und 2.14.2.5). Die Identität der verschiedenen Arachidonsäure-Metabolite wurde durch Cochromatographie von unmarkierten authentischen Verbindungen bestimmt.

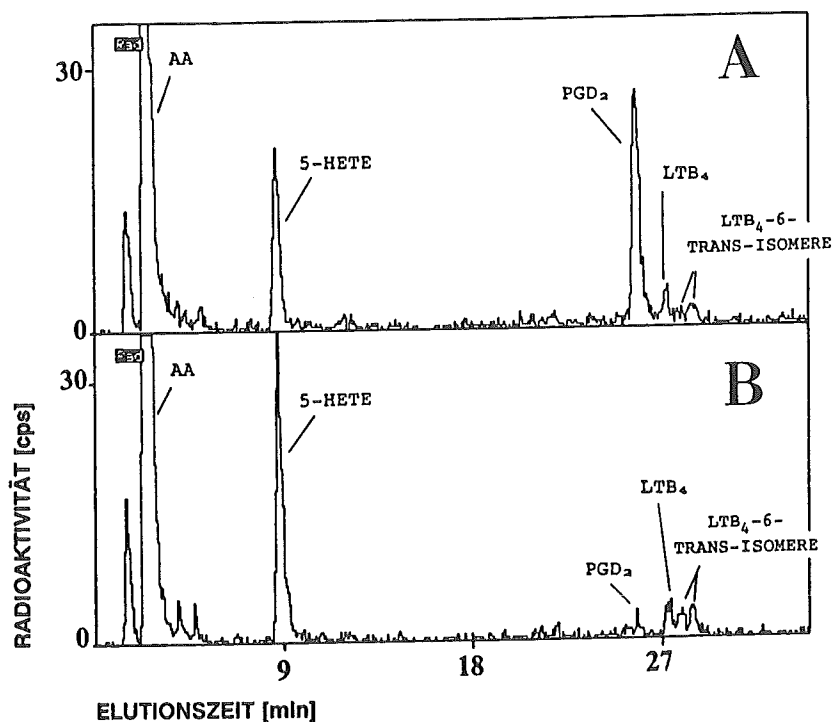


Abb. 2.33: Selektive Hemmung der Cyclooxygenase in RBL-1-Zellen durch Indometacin: SP-HPLC-Trennung der Produkte, welche nach 5minütiger Inkubation von RBL-1-Zellen in Abwesenheit (A) und in Anwesenheit (B) von 10  $\mu\text{mol/l}$  Indometacin erhalten wurden (experimentelle Details: siehe 2.14.2.4 und 2.14.2.5). Die Identität der verschiedenen Arachidonsäure-Metabolite wurde durch Cochromatographie von unmarkierten authentischen Verbindungen bestimmt.

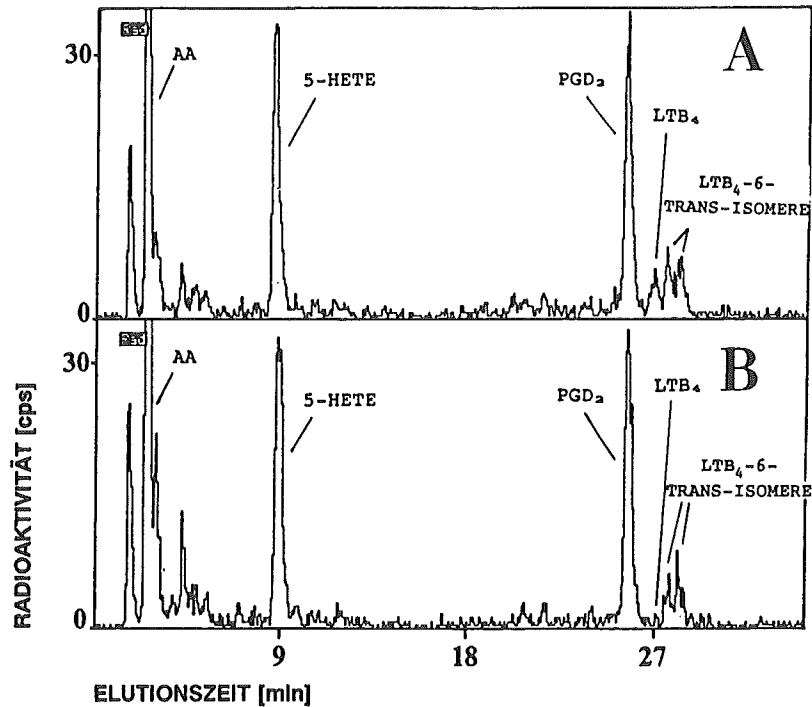


Abb. 2.34: Selektive Hemmung der  $LTA_4$ -Hydrolase in RBL-1-Zellen durch NAT 04-501: SP-HPLC-Trennung der Produkte, welche nach 5minütiger Inkubation von RBL-1-Zellen in Abwesenheit (A) und in Anwesenheit (B) von  $10 \mu\text{mol/l}$  NAT 04-501 erhalten wurden (experimentelle Details: siehe 2.14.2.4 und 2.14.2.5). Die Identität der verschiedenen Arachidonsäure-Metabolite wurde durch Cochromatographie von unmarkierten Referenz-Substanzen bestimmt.



## ***2.15 Inhibition des 12-Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-Weges in Mauskeratinozyten***

### ***2.15.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit***

Nach Inkubation von Maus-Keratinozyten mit  $^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure werden die radioaktiv markierten Oxidationsprodukte aus dem Reaktionsansatz extrahiert, mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) getrennt und mit einem Radiodetektor quantifiziert. Die Cyclooxygenase in Maus-Keratinozyten oxidiert die Arachidonsäure hauptsächlich zu Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) und Prostaglandin  $\text{D}_2$  ( $\text{PGD}_2$ ). Der größte Teil der Arachidonsäure wird jedoch über die 12-Lipoxygenase zu 12-HETE oxidiert, so daß sich dieses Testsystem für die Auffindung von 12-Lipoxygenase-Inhibitoren eignet, die besonders für die Therapie der Psoriasis wertvoll sein könnten.

### ***2.15.2 Material und Methoden***

#### ***2.15.2.1 Reagenzien***

Als Substrat wird 1- $^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure (spez. Akt. 54,5 Ci/mol) von NEN (Dreieich) verwendet. Alle weiteren benutzten Chemikalien haben p.a.-Qualität.

Die zu untersuchenden Substanzen werden in Ethanol gelöst (Stammlösung 2 mmol/l) und bei einer Endkonzentration von 20  $\mu\text{mol/l}$  geprüft.

#### ***2.15.2.2 Puffer und Lösungen***

Es werden folgende Puffer und Medien benötigt:

1. RPMI-Medium (Boehringer, Mannheim) + 10 % FKS
2. RPMI-Medium (Boehringer, Mannheim) (ohne FKS)

3. Phosphate buffered saline (PBS) + Trypsin 0,5 %:  
8,0 g NaCl  
0,2 g KCl  
1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
5,0 g Trypsin (Sigma, München)  
werden mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt, der pH-Wert beträgt 7,0.
4. Phosphat-Puffer (10 mmol/l, pH 7,4) mit 0,95 % (w/w) NaCl

#### *2.15.2.3 Isolierung der Mauskeratinozyten*

Zwanzig NMRI Mäuse werden in einem luftdichtem Gefäß mit CO<sub>2</sub>-Gas abgetötet. Die Schwänze werden abgesetzt und 1 h bei 37 °C mit PBS-Puffer (0,5 % Trypsin) inkubiert. Die Mäuseschwänze werden der Länge nach mit einem Skalpell eingeritzt und die Haut von den Knochen abgezogen. Die abgezogenen Schwanzhäute werden dann abermals 1 h bei 37 °C mit PBS-Puffer 0,5 % Trypsin inkubiert. Danach werden die Häute 3 x mit RPMI-Medium + 10 % FKS gewaschen (in 6,5 cm  $\phi$  Kristallisierschalen). Die Häute werden noch einmal bei 37 °C 1 h in RPMI-Medium (ohne FKS) inkubiert.

Nach der Inkubation, werden die oberen Hautschichten (mit den Haaren) in RPMI-Medium (+ 10 % FKS) entfernt. Mit einem Glasstab werden dann die Keratinozyten abgelöst. Die restlichen größeren Fragmente werden entfernt und verworfen. Die Zellen werden abzentrifugiert (1000 x g, 5 min), 3mal mit Phosphatpuffer gewaschen, in ca. 20 ml Phosphatpuffer aufgenommen und bis zur Inkubation bei 4 °C aufbewahrt.

#### *2.15.2.4 Inkubation und Extraktion*

Nach Zugabe von 25  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub>-Lösung (Endkonzentration 2 mmol/l) wird die Keratinozyten-Zell-Suspension (2,4 ml) auf 25 °C erwärmt. 25  $\mu$ l der Substanzstammlösung oder geeigneter Verdünnungen in PBS oder Ethanol werden 3 min bei 25 °C mit den Mauskeratinozyten vorinkubiert. Die Inkubation (10 min, 37 °C) wird durch Zugabe von 10  $\mu$ l Arachidonsäure in Tris-Puffer (0,2 mol/l, pH 9,5), 10  $\mu$ l 1-<sup>14</sup>C-Arachidonsäure (54,5 Ci/mol, insgesamt 0,1  $\mu$ Ci) in Ethanol und 5  $\mu$ l Calcium-Ionophor A23187 in Ethanol gestartet. Die Endkonzentrationen

betragen 50  $\mu\text{mol/l}$  für die Arachidonsäure und 6  $\mu\text{mol/l}$  für das Calcium-Ionophor A23187. Die Endkonzentration an Ethanol soll 4 % nicht übersteigen bei einem Inkubationsvolumen von 2,5 ml.

Die Inkubationen werden durch Zugabe von 0,525 ml 1 %ige Ameisensäure gestoppt; die Reaktionsprodukte werden nacheinander mit 5 ml Chloroform/Methanol (1:1) und 2 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden am Rotationsverdampfer eingedampft, der Rückstand im Laufmittel (60  $\mu\text{l}$ ) gelöst und direkt in das HPLC-System injiziert.

#### 2.15.2.5 HPLC-Analyse

HPLC-System: Hewlett Packard 1084 B

Säule: Lichrosorb 60, 7  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 4 mm (Merck, Darmstadt)

Laufmittel: Laufmittel A: n-Hexan/Methanol/2-Propanol (972:18:10, v/v);

Laufmittel B: n-Hexan/Methanol/2-Propanol (972:18:70, v/v); die Laufmittel enthalten 0,1 % Essigsäure und 0,02 % Wasser;  
Von 0 - 12 min beträgt der Anteil von Laufmittel B 15 %; von 12 - 27 min steigt der Anteil von Laufmittel B in einem linearen Gradienten von 15 % auf 95 %

Flußrate: 2 ml/min

Radioaktivitätsmonitor: LB 505, Berthold, Wildbad

#### **2.15.2.6 Auswertung**

Mit Hilfe der hier verwendeten HPLC-Analyse können 12-HETE und alle entstehenden Cyclooxygenaseprodukte getrennt und quantitativ erfaßt werden. Die 12-HETE-Peakfläche bezogen auf die Gesamtradioaktivität repräsentiert die Aktivität der 12-Lipoxygenase, die Summe der  $\text{PGE}_2$ -,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ - und  $\text{PGD}_2$ -Peakfläche bezogen auf die Gesamtradioaktivität die Aktivität der Cyclooxygenase in diesem System.

#### **2.15.3 Ergebnisse und Diskussion**

Dieses Testsystem wurde zur Auffindung von potentiellen Wirkstoffen, die für die Therapie der Psoriasis wertvoll sein könnten, etabliert. Da im psoriatischem Gewebe als Haupt-Arachidonsäuremetabolit 12R-HETE mit auf Granulozyten deutlich größerer chemotaktischer Wirkung als 12S-HETE, dem Produkt der Thrombozyten-12-Lipoxygenase, nachgewiesen wurde, lag der Verdacht, daß es sich bei dem Mauskeratinozyten-12-Lipoxygenase-Produkt um 12R-HETE handelt, nahe. Abbildung 2.35 zeigt die entstandenen Arachidonsäuremetabolite aus einer Inkubation von Mauskeratinozyten mit  $^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure. Ein Hauptanliegen war die Bestimmung der genauen sterischen Konfiguration der 12-Hydroxy-Gruppe des 12-HETE-Produktes. Die Enantiomere 12S-HETE und 12R-HETE lassen sich mit den gebräuchlichen HPLC-Säulen nicht voneinander separieren. Dagegen sind die nach Inkubation mit 5-Lipoxygenase resultierenden Diastereomere 5S,12S-DiHETE und 5S,12R-DiHETE ( $\text{LTB}_4$ ) leicht voneinander zu trennen. Zu diesem Zweck wurde 12-HETE aus einem Inkubationsansatz in präparativem Maßstab mit Hilfe der HPLC gereinigt und das isolierte Produkt in Gegenwart von Schweinegranulozyten-5-Lipoxygenase inkubiert. Dieses Enzym fügt spezifisch am C-Atom 5 eine Hydroxyl-Gruppe in S-Konfiguration ein. Die nachfolgende HPLC-Analyse ergab als einziges Reaktionsprodukt 5S,12S-DiHETE. 5S,12R-DiHETE wurde nicht gebildet (Abb. 2.36).

Aufgrund dieses Ergebnisses muß angenommen werden, daß die Maus-Keratinozyten-12-Lipoxygenase sich in der Produktspezifität nicht von 12-Lipoxygenasen vieler anderer Zellen unterscheidet.

Möglicherweise ist die Produktspezifität der 12-Lipoxygenase menschlicher Keratinozyten oder sogar speziell im psoriatischem Gewebe nicht die gleiche wie beim Mausenzym. Deswegen sollten menschliche Keratinozyten - auch psoriatischer Herkunft - in Kultur genommen und untersucht werden. Bei ersten Versuchen mit einer menschlichen Keratinozyten-Zelllinie (NTC 2544) konnte gezeigt werden, daß in der Zellkultur die Zellen die Fähigkeit, Arachidonsäureprodukte zu generieren eingebüßt hatten. Die 12-Lipoxygenase ließ sich auch durch Medienwechsel oder geringe DMSO-Konzentrationen im Medium nicht induzieren. Dieses Testsystem bedarf noch weiterer Untersuchungen und Erfahrungen, um für das Substanzscreening eingesetzt zu werden.

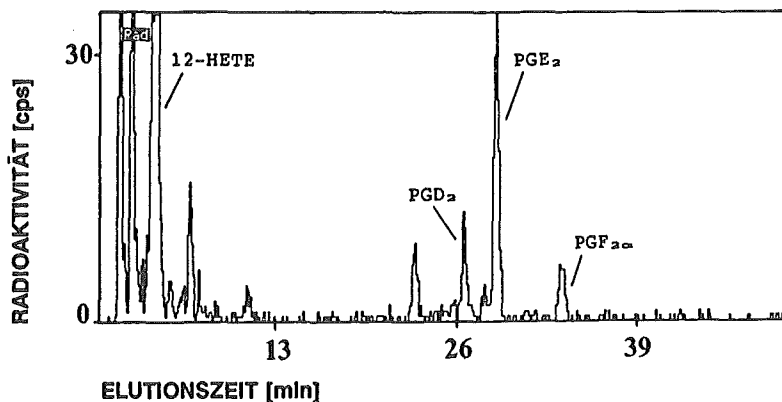


Abb. 2.35: SP-HPLC-Trennung der Produkte, welche nach 10minütiger Inkubation von Mauskeratinozyten mit  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure gebildet wurden (experimentelle Details: siehe 2.15.2.4 und 2.15.2.5). Die Identität der radioaktiv markierten Arachidonsäure-Produkte wurde durch Cochromatographie von unmarkierten authentischen Verbindungen bei Wellenlängen von 200 und 235 nm bestimmt.

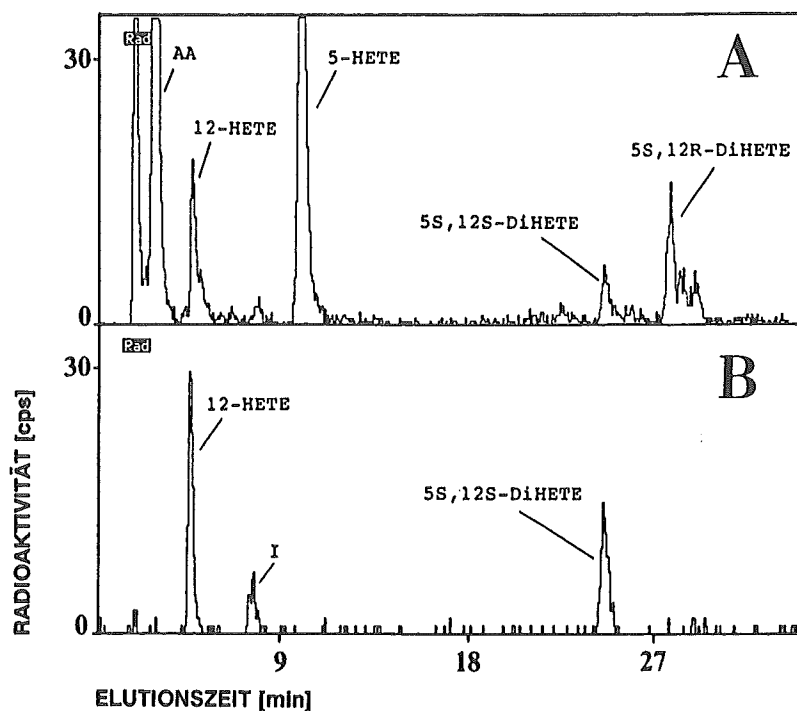


Abb 2.36: Bestimmung der sterischen Konfiguration von  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -12-HETE, welche von Mauskeratinozyten gebildet wurde.

(A) Ein typisches SP-HPLC-Chromatogramm der Arachidonsäure-Produkte, welche nach 5minütiger Inkubation von Schweinegranulozyten mit  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure, Kalzium-Ionophor A23187 und ETYA gebildet wurden. Dieses Chromatogramm diente als Referenz für die Retentionszeiten von 5S,12S-DiHETE und 5S,12R-DiHETE.

(B) SP-HPLC Trennung der Produkte aus einer 5minütigen Inkubation von aus Mauskeratinozyten isolierter  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -12-HETE ( $1\text{ }\mu\text{g}$ ) mit Schweinegranulozyten ( $2,5\text{ ml}$ ,  $4 \times 10^7$  Zellen/ml). Die Analyse der radioaktiv markierten Produkte erfolgte mit Hilfe des Durchfluß-Radioaktivitätsdetektors LB 505 (Berthold, Wildbad, FRG). Die Substanz I ist ein unidentifiziertes 12-HETE-Zerfallsprodukt.

## **2.16 Prüfung auf Glutathion-Peroxidase-ähnliche Aktivität**

### **2.16.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Nach Inkubation von  $^{14}\text{C}$ -15-HPETE in Gegenwart von GSH und Prüfsubstanzen können die entstandenen radioaktiv markierten reduzierten Produkte ( $^{14}\text{C}$ -15-HETE und  $^{14}\text{C}$ -iso-15-HETE) aus dem Inkubationsansatz extrahiert und mit Hilfe der Hochdruck-flüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert werden. Diese Untersuchungen können in vitro und ex vivo (Plasmaextrakt von Tieren, die mit Prüfsubstanz behandelt worden sind) durchgeführt werden.

Das Enzym Glutathion-Peroxidase (GSH-Px, mehrere Isoenzyme) ist für die Reduzierung von Hydroperoxiden einschließlich der Phospholipid-Hydroperoxide verantwortlich. Diese Peroxide verursachen Schädigungen an zellulären Membransystemen und biologisch bedeutenden Makromolekülen, denen man eine wesentliche Bedeutung bei degenerativen Prozessen (Altern, chronische Entzündungen, Atherosklerose) zuspricht. Substanzen mit GSH-Px-ähnlicher Aktivität sollten daher potentielle Pharmaka für die Therapie solcher Erkrankungen darstellen.

### **2.16.2 Material und Methoden**

#### **2.16.2.1 Reagenzien**

Als Substrate werden 1- $^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure (spez. Aktivität: 54,5 Ci/mol) von NEN (Dreieich) und Arachidonsäure (99 % rein, Sigma, München) verwendet. Sojabohnen-Lipoxygenase und GSH sind von Sigma (München). Alle weiteren benutzten Chemikalien haben p.a.-Qualität.

#### **2.16.2.2 Herstellung von $^{14}\text{C}$ -15-HPETE**

Das Substrat zur Messung der GSH-Peroxidase-ähnlichen Aktivität wird vor den Messungen frisch hergestellt. 700 µl einer Sojabohnen-Lipoxygenaselösung (0,1 mg/ml Tris/HCl-Lösung) wird mit 300 µl Arachidonsäure in 20 ml Tris/HCl-Puffer (13 mmol/l, pH 9,5) und 100 µl 1- $^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure (insgesamt 1 µCi, 54,5 Ci/mol) zusammen bei 37 °C inkubiert.

Nach 15 min ist die Arachidonsäure fast vollständig zu 15-HPETE und geringen Mengen von 15-HETE, 15-Keto-ETE und 15-iso-HETE metabolisiert worden. Die Inkubationslösung wird dann bei 4 °C bis zur Substanzinkubation aufbewahrt.

#### ***2.16.2.3 Herstellung der Rattenplasmaextrakte***

Bei der Ex-vivo-Prüfung werden Plasma-Extrakte von mit der Prüfsubstanz behandelten Ratten eingesetzt. Männliche Wistar-Ratten werden über Nacht nüchtern gesetzt. Die Substanzen werden in Tylose-Suspension per Schlundsonde oral verabreicht. Das Blut (5 ml) wird nach 3 h aus der Vena cava entnommen und sofort mit 0,5 ml Liquemin-Lösung versetzt. Dann wird das Blut bei 6000 x g 10 min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Plasma (ca. 3 ml) wird von den sedimentierten Blutzellen getrennt, 1,5 ml davon mit 0,5 ml Lösung 4 verdünnt und über eine C18 Bond-Elut Säule (ict Handelsgesellschaft, Frankfurt) gegeben. Die Säule wird vorher mit 2 ml Methanol und 2 ml dest. Wasser vorbehandelt. Das Eluat wird aufgefangen (Volumen 1). Die Säule wird dann mit 3 ml destilliertem Wasser gewaschen; danach werden die Produkte mit 2 ml Methanol eluiert (Volumen 2). Volumen 1 wird mit 300 µl HCl (1 mol/l) angesäuert und über eine Säule gegeben, welche mit 2 ml Methanol und 2 ml saurem Wasser (pH 2,0) vorbehandelt wurde. Die Säule wird mit 6 ml saurem Wasser gewaschen, die Produkte werden mit 6 ml Methanol extrahiert (Volumen 3). Volumen 2 und Volumen 3 werden gepoolt und eingedampft, der Rückstand wird in 25 µl Ethanol gelöst und anstelle der Testsubstanz in vitro auf GSH-Px-ähnliche Aktivität geprüft (siehe 2.16.2.4).

#### ***2.16.2.4 Inkubation und Extraktion***

Zur Inkubation mit Prüfsubstanzen oder Plasmaextrakten werden 2,5 ml der vorher hergestellten Substratlösung auf 37 °C aufgewärmt und 5 min in Gegenwart von reduziertem Glutathion (20 mmol/l) mit der Substanz (25 µl, in Ethanol) oder Rattenplasmaextrakten inkubiert.

Unmittelbar nach der Inkubation wird die Reaktion im Eisbad auf 4 °C abgekühlt und das Reaktionsgemisch 2 x mit 3 ml eis-



kaltem Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden gepoolt und am Rotationsverdampfer eingedampft.

Zur HPLC-Analyse werden die Rückstände im Laufmittel (60 µl) gelöst und ohne weitere Aufbereitung in den HPLC injiziert.

#### **2.16.2.5 HPLC-Analyse**

HPLC-System: Hewlett Packard 1084 B

Säule: Lichrosorb 60, 7 µm, 250 mm x 4 mm (Merck, Darmstadt)

Laufmittel: Laufmittel A: n-Hexan/2-Propanol (998:2, v/v);  
Laufmittel B: n-Hexan/2-Propanol (972:10, v/v); die Laufmittel enthalten 0,1 % Essigsäure und 0,02 % Wasser;

Von 0 - 12 min beträgt der Anteil von Laufmittel B 25 %; von 12 - 27 min steigt der Anteil von Laufmittel B in einem linearen Gradienten von 25 % auf 95 %

Flußrate: 2 ml/min

Radioaktivitätsmonitor: LB 505, Berthold, Wildbad

#### **2.16.2.6 Dünnschichtchromatographie**

Zur dünnschichtchromatographischen Analyse der Produkte werden die Rückstände in 100 µl einer Diethylether/Methanol Mischung (70:30, v/v) gelöst und auf HPTLC-Platten Kieselgel 60 (Merck, Darmstadt) aufgetragen.

Das zur Entwicklung der Dünnschichtplatten verwendete Laufmittelgemisch besteht aus Petrolether/Diethylether/Essigsäure (45:55:1, v/v).

Zur Analyse der radioaktiv markierten Produkte wird der Dünnschichtscanner LB 284 (Berthold, Wildbad) eingesetzt.

### *2.16.2.7 Auswertung*

Mit Hilfe der hier verwendeten HPLC- und dünnschichtchromatographischen Methode können 15-HETE, 15-HPETE und 15-iso-HETE getrennt und quantitativ erfaßt werden. Die Summe der 15-HETE- und 15-iso-HETE-Peakflächen, bezogen auf die Gesamtradioaktivität, repräsentiert die GSH-Peroxidase-ähnliche Aktivität einer Substanz oder eines Plasmaextraktes und wird in % Aktivität der Referenzsubstanz Ebselen angegeben.

### *2.16.3 Ergebnisse und Diskussion*

Diese Methode wurde entwickelt, um den Einfluß von Substanzen auf die Reduktion von Hydroperoxiden direkt messen und Aussagen über das Schicksal dieser Hydroperoxide machen zu können. Es wurde mit 15-HPETE ein Substrat gewählt, welches auch in Körperzellen durch die 15-Lipoxygenase und durch Autoxidation der Arachidonsäure entstehen und Membranen und Makromoleküle schädigen kann. Im Verlaufe des Screenings waren für uns besonders solche Substanzen von Interesse, welche enzymähnlich unter Verbrauch von GSH die Reduktion von Hydroperoxiden katalysierten. Solch ein Mechanismus konnte für Ebselen und für Substanzen aus dem Ebselen-Umfeld nachgewiesen werden. Es wurden 30 Substanzen aus dem Ebselen-Umfeld in diesem Testmodell in vitro und ex vivo bei einer Dosis von 30 mg/kg geprüft. Abbildung 2.37 zeigt die GSH-Peroxidase-ähnliche Aktivität des Plasmaextraktes einer Ratte, welche mit 30 mg/kg NAT 06-489 vorbehandelt wurde. Tabelle 2.31 zeigt den Vergleich der In-vitro- mit den Ex-vivo-Daten. Wie auf Grund von Metabolismusstudien zu erwarten war, ist bei diesen metabolisch nicht stabilen Substanzen eine In-vitro-/Ex-vivo-Korrelation kaum erkennbar.

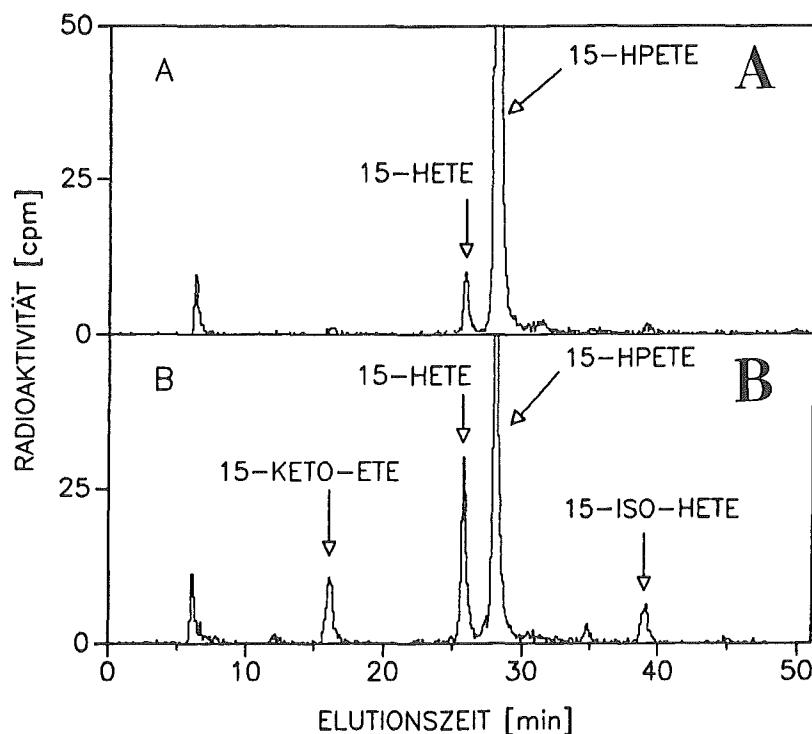


Abb. 2.37: GSH-Px-Aktivität eines Plasmaextraktes, welcher aus einer mit NAT 06-489 behandelten Ratte nach 3 h gewonnen wurde; SP-HPLC-Trennung der Produkte, die nach 5minütiger Inkubation von Plasmaextrakt aus einem Kontrolltier (A) und aus dem mit NAT 06-489 behandelte Tier (B) mit  $^{14}\text{C}$ -15-HPETE und GSH gebildet wurden (experimentelle Details: siehe 2.16.2.3, 2.16.2.4 und 2.16.2.5). Die Identität der verschiedenen 15-HPETE-Produkte wurde mit Hilfe von GC-MS und NMR nachgewiesen.

*Tab. 2.31: Wirkungen von Substanzen aus dem Ebselen-Umfeld und der Plasmaextrakte aus mit diesen Substanzen behandelten Ratten auf die Reduktion von 15-HPETE zu 15-HETE. Experimentelle Details siehe: 2.16.2.3 und 2.16.2.4.*

Substanz	% der Ebselen GSH-Px-ähnlichen Aktivität	
	in vitro (10 µmol/l)	ex vivo (30 mg/kg)
Ebselen	100	100
NAT 02-755	3	21
NAT 02-761	53	14
NAT 02-762	220	20
NAT 02-834	0	155
NAT 06-032	0	222
NAT 06-097	307	0
NAT 06-099	51	105
NAT 06-103	31	11
NAT 06-122	55	138
NAT 06-123	89	161
NAT 06-124	53	84
NAT 06-398	262	128
NAT 06-447	0	0
NAT 06-487	40	156
NAT 06-489	16	231
NAT 06-496	47	8
NAT 06-500	4	68
NAT 06-505	179	161
NAT 06-526	320	14
NAT 06-531	10	205
NAT 06-552	10	219
NAT 06-555	13	142
NAT 06-564	n.b.	31
NAT 06-570	55	170
NAT 06-575	6	0
NAT 06-577	0	9
NAT 06-591	9	15
NAT 06-557	19	n.b.
NAT 06-561	85	51

n.b. = nicht bestimmt

## **2.17 Inhibition von Kollagenasen**

Dieses Kapitel ist Bestandteil der Diplomarbeit von Martin Beuck (Münster, 1985).

### **2.17.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Die Bedeutung der proteolytischen Aktivitäten, insbesondere die der Kollagenase, für den Abbau von Knorpelgrundsubstanz bei rheumatoiden Arthritiden macht die Entwicklung von Protease-Inhibitoren als Therapeutika sinnvoll. Die Prüfung von Substanzen bzw. Extrakten aus Drogen oder Pflanzenzellkulturen auf inhibitorische Wirkung auf die Kollagenase im sogenannten Grundscreening setzt aussagekräftige und schnell durchzuführende Verfahren zur Bestimmung der Aktivität der Kollagenase voraus.

So waren im Rahmen des Projekts zunächst einmal die literaturbekannten Aktivitätstests zu überprüfen und notfalls so zu modifizieren, daß sie schnell durchführbar und reproduzierbare Ergebnisse lieferten. Das Prinzip und die experimentelle Durchführung dieser Verfahren sind im Material- und Methoden-Teil beschrieben.

Für die Reinigung der Kollagenase aus polymorphkernigen Leukozyten (PMNL), die bei Entzündungen in großer Zahl in das Entzündungsgebiet einwandern, sollte ein Reinigungsverfahren erarbeitet und das Enzym hinsichtlich Spezifität und kinetischer Daten charakterisiert werden.

Daneben sollte geprüft werden, ob bakterielle und PMNL-Kollagenase in ihren Eigenschaften solche Ähnlichkeit besitzen, daß mit Hilfe der bakteriellen Kollagenase erzielte Ergebnisse auf die PMNL-Kollagenase übertragbar sind.

### **2.17.2 Material und Methoden**

#### **2.17.2.1 Material**

- Elektrophoreseapparaturen:
  - a) SDS-Gelelektrophorese:
    - LKB 2001 Elektrophoresekammer (LKB, Bromma, Schweden)
    - Bio Rad Elektrophoresekammer (Bio Rad, München)

- b) Hochspannungsgerät:  
LKB 2197 Power Supply (LKB, Bromma, Schweden)
- Geräte für Säulenchromatographie:
  - a) Fraktionssammler:  
LKB 7000 Ultrorac (LKB, Bromma, Schweden)
  - b) Optische Einheit:  
LKB 2089 UV Cord II (LKB, Bromma, Schweden)
  - c) Pumpen:  
Abimed, Minipuls 2 (Abimed, Düsseldorf)  
Microperpex 2132 (LKB, Bromma, Schweden)
- pH-Meßgerät und Zubehör:  
Beckman Digital-pH-Meter Modell 3500  
Einstabmeßkette Beckman Nr. 39520
- Spektralphotometer:  
Beckman Spektralphotometer, Modell 34 (Beckman, München)
- Szintillationszähler:  
Packard 300 C (Packard, Frankfurt a. M. )  
LKB 1219 (Pharmacia/LKB, Freiburg)
- Ultraschallgerät:  
Sonifier B-12 (Branson, Danburg, USA)
- Zentrifugen:
  - a) Kühlzentrifuge Beckman J2-21 (Beckman, München)
  - b) Ultrazentrifuge Beckman L8-70M (Beckman, München)
  - c) Tischzentrifuge Labofuge 6000 (Heraeus, Hanau)
- Ultrafiltrationsgeräte:
  - a) Minicon Mikrokonzentratoren (Amicon, Witten)
  - b) Amicon Ultrazentrifugationszelle mit den Membranen:  
YM 10, Ausschlußgrenze 10.000  
YM 30, Ausschlußgrenze 30.000
- Chemikalien:
 

Acrylamid, reinst	Serva (Heidelberg)
4-Aminophenylmercuroacetat	Sigma (Taufkirchen)
Ammoniumperoxodisulfat	Serva (Heidelberg)
BrCN-aktivierte Sepharose 4B	Pharmacia (Freiburg)
Calciumchlorid p.a.	Merck (Darmstadt)

Coomassie Brilliant Blue G250	Serva (Heidelberg)
Concanavalin-A-Sepharose	Pharmacia (Freiburg)
Citronensäure p.a.	Merck (Darmstadt)
DEAE-Sephacel	Pharmacia (Freiburg)
Dextran G-250	Serva (Heidelberg)
Eichproteingemische HMW + LMW	Pharmacia (Freiburg)
Fluorescamin	Sigma (Taufkirchen)
Glycin p.a.	Merck (Darmstadt)
Gly-Tyr	Serva (Heidelberg)
Harnstoff p.a.	Serva (Heidelberg)
2-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Mersalyl	Sigma (Taufkirchen)
1-O-Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid	Sigma (Taufkirchen)
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva (Heidelberg)
Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg	Serva (Heidelberg)
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma (Taufkirchen)
Sephacryl S-200, S-300	Pharmacia (Freiburg)
SDS reinst	Serva (Heidelberg)
TEMED	Serva (Heidelberg)
Trichloressigsäure	Riedel De Haen (Seelze)
Tris	Merck (Darmstadt)

## 2.17.2.2 Methoden

### 2.17.2.2.1. Reinigung und Charakterisierung von PMNL-Kollagenase

#### 2.17.2.2.1.1 Gewinnung von PMN-Leukozyten

Bei der Isolierung von Leukozyten nach Ohlsson K. (1971) wird von einem Leukozytenkonzentrat, dem sogenannten "Buffy Coat", ausgegangen. "Buffy Coat" ist ein Überstand, der aus venösem Frischblut nach vorsichtiger Zentrifugation erhalten wird. Die Blutgerinnung wird dabei durch 10 %igen Zusatz (v/v) einer Citratlösung (3,8 %ig an Citronensäure in 0,15 mol/l NaCl) verhindert.

Zur Isolierung der Leukozyten werden die Erythrozyten sedimentiert. Dazu wird das "Buffy Coat" mit dem gleichen Volumenteil eiskalter isotonischer Kochsalzlösung, die 3 % (w/v) Dextran G250 enthält, gemischt. Nach einer einstündigen Sedimentation der Erythrozyten bei 4 °C wird das überstehende

Plasma mit den Leukozyten abgenommen und 8 Minuten mit 600 x g bei 4 °C (J2-21 Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Die im Sediment verbleibenden Resterythrozyten wurden durch Zugabe von 100 ml eiskalter NaCl-Lösung (0,03 mol/l) hämolysiert. Nach 20 sec wird zur Wiederherstellung der Isotonie mit 100 ml eiskalter NaCl-Lösung (0,28 mol/l) versetzt und erneut zentrifugiert (10 min mit 400 x g bei 4 °C). Dieser Vorgang der osmotischen Lyse wird dreimal wiederholt, wobei die Leukozyten anschließend frei von kontaminierenden Erythrozyten sind.

Zum Abschluß der Reinigung werden die Leukozyten noch viermal mit eiskalter 0,9 %iger (w/v) NaCl-Lösung gewaschen. Nach jedem Waschvorgang wird 5 min bei 4 °C mit 110 x g zentrifugiert.

#### ***2.17.2.2.1.2 Isolierung und Extraktion lysosomaler Granula aus PMN-Leukozyten***

Die weitere Aufarbeitung der PMN-Leukozyten erfolgte nach einer Methode von Tschesche H. et al. (pers. Mitteilung).

Die PMN-Leukozyten werden in Tris/HCl (0,05 mol/l), pH 7,4, NaCl (0,15 mol/l), KCl (0,025 mol/l) und  $MgCl_2$  (0,005 mol/l) im Verhältnis Puffer : Pellet = 5 : 1 (Engelbrecht et al. 1982) resuspendiert. Die Zellsuspension wird in einem Autoklaven oder einer Parr-Bombe für 15 min unter einem Druck von 4,8-5,5 MPa (48-55 bar) gesetzt. Nach schnellem Ablassen des Druckes wird anschließend zur Abtrennung der Granula, Zellkerne und Mitochondrien von den zytoplasmatischen Proteinen ultrazentrifugiert (L8-70M Ultrazentrifuge, 4 h bei 48.000 x g, 4 °C).

Das Pellet wird nun zweimal mit Citratpuffer (0,02 mol/l), pH 6,0,  $CaCl_2$  (0,005 mol/l),  $ZnCl_2$  (0,5 mol/l) und 0,05 % (w/v) Brij 35 extrahiert. Die Extraktion beinhaltet die Kombination von Beschallung und Homogenisation. Nach dem Beschallen (3 min über einen Zeitraum von 6 min verteilt) werden die subzellulären Strukturen in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert (10 Hube). Nach einer zweiten Beschallung wird mit 48.000 x g bei 4 °C zentrifugiert (L8-70M Ultrazentrifuge) und der unlösliche Rückstand einer zwei-



ten Extraktionsprozedur unterzogen. Diese wird analog zur ersten durchgeführt, nur diesmal unter Zusatz von 0,1 mol/l NaCl. Die beiden erhaltenen Überstände werden vereinigt.

Anschließend werden die Serin-Proteasen Elastase und Kathepsin G irreversibel inhibiert. Die Inhibition erfolgt mit 5 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF-Lösung in Dioxan), welches unter Schütteln zugesetzt wird. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wird denaturiertes Protein und ausgefallenes PMSF durch eine 15minütige Zentrifugation bei 2.000 x g, 4 °C (J2-21 Kühlzentrifuge) aus der Lösung entfernt.

#### *2.17.2.2.1.3 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel*

Die Extraktionslösung wird gegen 0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,6, 0,1 mol/l NaCl und 0,005 mol/l  $\text{CaCl}_2$  dialysiert und über eine gegen gleichen Puffer äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule (20 x 1 cm) mit einer Flußgeschwindigkeit von 5 ml/h 16 h zirkuliert. Die Säule wird anschließend mit obigem Puffer proteinfrei gewaschen und das Eluat durch Ultrafiltration aufkonzentriert.

#### *2.17.2.2.1.4 Gelfiltration an Sephacryl S-200*

Die Vorbereitung des Säulenmaterials und die Füllung der Säule wird entsprechend den Angaben des Herstellers (Produktinformationen der Fa. Pharmacia Fine Chemicals) durchgeführt.

Das Säulenmaterial wird vor der Gelfiltration mit 0,05 mol/l Tris/HCl-Puffer, pH 7,6, 0,5 mol/l NaCl und 0,005 mol/l  $\text{CaCl}_2$  äquilibriert.

Wegen der äußerst geringen Mengen Kollagenase, die für diesen Reinigungsschritt zur Verfügung standen, war eine Detektion des Proteins im Eluat über seine Absorption bei 280 nm nicht möglich. Die Sephacryl S-200 Säule (10 x 700 mm) wurde deshalb mit zwei Proteinen geeicht (Rinderserumalbumin  $M_r$  67.000 und Phosphorylase b  $M_r$  = 94.000), um die Grenzen festzulegen, innerhalb derer die Kollagenase eluiert wird.

Die innerhalb dieser Grenzen eluierten Fraktionen wurden auf Kollagenase-Aktivität geprüft (s. 2.17.2.2.3.4b), vereinigt und durch Ultrafiltration konzentriert.

#### **2.17.2.2.1.5 Affinitätschromatographie an Kollagen-Sepharose 4B**

##### **a) Darstellung von Kollagen-Sepharose**

Die Präparation der Kollagen-Sepharose 4B erfolgte nach der, in den Produktinformationen der Pharmacia Fine Chemicals, beschriebenen Methode (Pharmacia). Die gefriergetrocknete CNBr-Sepharose 4B wird 15 min in 1 mmol/l HCl gequollen. Ein Gramm getrockneter Sepharose ergab so ein Volumen von ca. 3,5 ml. Nach Sedimentation des gequollenen Gels werden die Fines (Matrixbruchstücke) abgesaugt und das Gel 2mal mit 1 mmol/l HCl gewaschen. Nach der Überführung des Gels in den Kopplungspuffer (0,1 mol/l NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 mol/l NaCl, pH=8,3) wird sofort eine Kollagenlösung (2 mg/ml Kollagen (siehe 2.17.2.2.2.1) über Nacht in 0,2 mol/l Essigsäure gelöst und gegen den Kopplungspuffer dialysiert) zugesetzt. Für einen Milliliter Sepharosegel werden 2 mg Kollagen eingesetzt; die Suspension wird anschliessend 3 h bei 4 °C leicht geschüttelt.

Nach der Kopplungsreaktion wird das Gel sedimentiert und der Überstand abdekantiert. Zur Absättigung noch vorhandener reaktiver Gruppen wird das Gel erneut mit Kopplungspuffer, der jetzt aber zusätzlich noch 0,2 mol/l Glycerin enthält, versetzt. Die Suspension wird wiederum 3 h bei 4 °C vorsichtig geschüttelt. Zur Entfernung nicht umgesetzten Proteins wird das Gel zunächst mit Kopplungspuffer, dann mit 0,1 mol/l Natriumacetatpuffer, pH 4,0, 0,5 mol/l NaCl ausgiebig gewaschen. Anschließend wird das Gel in den Puffer für die Affinitätschromatographie überführt.

##### **b) Durchführung der Chromatographie**

Die Kollagenase wurde vor der Affinitätschromatographie gegen 0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,6, 0,2 mol/l NaCl, 0,005 mol/l CaCl<sub>2</sub> dialysiert und durch Zusatz von 300 µmol/l Mersalyl und 2stündiger Inkubation bei 37 °C aktiviert. Die Enzymlösung wurde dann bei 4 °C für 16 h über die Kollagen-Sepharose-Säule (1 x 12 cm), die mit dem gleichen Puffer äquilibriert

war, mittels einer Schlauchpumpe mit einer Flußgeschwindigkeit von ca. 5 ml/h zirkuliert. Die Elution der Säule (5 ml/h) erfolgte zunächst mit dem Äquilibrierungspuffer, um nicht-gebundenes Protein zu entfernen (ca. 100 ml). Danach wurde die Kollagenase mit dem gleichen Puffer in Gegenwart von 0,5 mol/l NaCl eluiert (ca. 100 ml). Das Eluat wurde zur Bestimmung der Kollagenase-Aktivität durch Ultrafiltration konzentriert, gegen den Äquilibrierungspuffer dialysiert, mit Einmalfilterhaltern (0,2 µm, Sartorius) sterilfiltriert und nach Aliquotierung und schockfrieren mit flüssigem Stickstoff bei -20 °C gelagert.

#### ***2.17.2.2.1.6 SDS-Gelelektrophorese nach Lugtenberg***

Zur Kontrolle der Reinigungsschritte bei der Isolierung der PMNL-Kollagenase und zur Bestimmung der relativen Molekülmasse von Kollagenase wird eine SDS-Gelelektrophorese nach Lugtenberg et al. (1975) in einer BioRad-Vertikalelektrophoreseapparatur durchgeführt:

##### ***a) Herstellung der Gele und Probenvorbereitung***

Für die Elektrophorese werden 1,5 mm dicke Gele mit Hilfe der in Tab. 2.32 aufgeführten Reagenzien hergestellt. Zur Herstellung des Trenngels (%T = 10,1, %C = 2,0) werden die unter a-e angegebenen Volumina zusammengegeben und unter Wasserstrahlvakuum entgast. Sofort nach der Zugabe von TEMED und Ammoniumperoxodisulfat wird die Lösung in die Polymerisationskassette gefüllt, wobei ca. 2 cm für das Sammelgel freigelassen werden. Die Polymerisation ist nach ca. 20 min beendet.

Das Sammelgel (%T = 3, %C = 2,6) wird in gleicher Weise mit den in Tab. 2.33 angegebenen Volumina hergestellt.

Zur Probenvorbereitung werden gleiche Volumenteile der zu untersuchenden Lösung mit dem Probenpuffer (Tab. 2.34) gemischt und 10 min auf 100 °C erhitzt.

Als Elektrodenpuffer wird ein Tris/HCl Puffer (25 mmol/l), pH = 8,3, 200 mmol/l Glycin und 0,1 % (w/v) SDS verwendet. Nach dem Einfüllen der Proben in die Geltaschen (30-40 µl) wird die elektrophoretische Auftrennung 15 h bei 50 V durchgeführt.

Die Proben im Gel werden anschliessend 2 h in 20 %iger (w/v) Trichloressigsäure fixiert und mit frisch angesetzter Färbelösung (0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R - 250 in Methanol/Essigsäure/Wasser (1:1:8, v/v) 2 h gefärbt. Entfärbt wird dann mit einem Gemisch aus Methanol/Essigsäure/ Wasser (1:1:8, v/v) so lange, bis der Untergrund klar ist.

Zur Bestimmung der relativen Molekülmassen wird ein Eichproteingemisch ( $M_r = 94.000 - 20.100$ ) von Pharmacia Fine Chemicals mit folgenden Proteinen verwendet:

Phosphorylase b	$M_r = 94.000$ ,
Rinderserumalbumin	$M_r = 67.500$ ,
Ovalbumin	$M_r = 43.000$ ,
Carbonsäureanhydrase	$M_r = 30.000$ ,
Trypsin-Inhibitor	$M_r = 20.100$ .

Tab. 2.32: SDS-Gelelektrophorese nach Lugtenberg et al.  
Zusammensetzung des Trenngels (ca. 40 ml)

Reagenz	Menge
a 30 % Acrylamid (w/v)	13,2 ml
b 1 % N,N'-Methylenbisacrylamid	8,0 ml
c 20 % SDS (w/v)	0,4 ml
d 2 mol/l Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,8	7,5 ml
e dest. Wasser	10,5 ml
f TEMED	20 µl
g 10 % Ammoniumperoxodisulfat (w/v)	0,4 ml

Tab. 2.33: SDS-Gelelektrophorese nach Lugtenberg et al.  
Zusammensetzung des Sammelgels (10 ml)

Reagenz	Menge
a 30 % Acrylamid (w/v)	1,0 ml
b 1 % N,N'-Methylenbisacrylamid	0,8 ml
c 20 % SDS (w/v)	50 µl
d 2 mol/l Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,8	625 µl
e dest. Wasser	7,4 ml
f TEMED	10 µl
g 10 % Ammoniumperoxodisulfat (w/v)	100 µl

**Tab. 2.34: SDS-Gelelektrophorese nach Lugtenberg et al.  
Zusammensetzung des Probenpuffers (100 ml)**

Reagenz	Menge
a 2 mol/l Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,8	3,1 ml
b 20 % SDS (w/v)	10,0 ml
c 0,4 % Bromphenolblau	250 µl
d Glycerin	10,0 ml
e dest. Wasser	71,6 ml
f 2-Mercaptoethanol	5,0 ml

#### *b) Auswertung*

Die Laufstrecken der Markerproteine werden mit den Logarithmen der angegebenen Molmassen mittels linearer Regressionsanalyse ausgewertet. Anhand der elektrophoretischen Laufstrecke der gereinigten PMNL-Kollagenase wird aus der erhaltenen Eichgeraden die molare Masse bestimmt.

#### **2.17.2.2.1.7 Bestimmung des Kollagen-Spaltungsmusters von PMNL-Kollagenase**

Kollagen (s. 2.17.2.2.2.1) wurde in 0,2 mol/l Essigsäure gelöst (2 mg/ml) und gegen 0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,6, 0,2 mol/l NaCl, 0,005 mol/l CaCl<sub>2</sub> dialysiert. Die gereinigte PMNL-Kollagenase (ca. 1 µg Protein) wurde zugesetzt und nach einer 24stündigen Inkubation bei 37 °C vom Inkubationsansatz eine SDS-PAGE nach Lugtenberg (2.17.2.2.1.6) angefertigt. Als Vergleich wurde eine Kollagenlösung ohne Enzymzusatz parallel inkubiert.

#### **2.17.2.2.2 Präparation und Radiomarkierung von Kollagen**

##### **2.17.2.2.2.1 Isolierung von Kollagen Typ I aus Rattenhaut**

Bei der Isolierung von Kollagen Typ I aus Rattenhaut nach der Methode von Cawston und Murphy (1979) wurde von 70 g Rattenhaut ausgegangen - alle Tätigkeiten wurden bei 4 °C durchgeführt:

Die Haut wurde mit Eis gekühlt, von Fettgewebe befreit und in kleine Stücke geschnitten. Die mit Trockeneis eingefrorene

Haut wurde in einem elektrischen Mixer möglichst fein zerkleinert und anschließend dreimal jeweils 30 min mit 1,5 l 0,9 %iger (w/v) NaCl in 0,01 mol/l Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, extrahiert. Die Haut wurde nach jeder Extraktion durch ein grobmaschiges Tuch filtriert und so von dem unerwünschten salzlöslichen Kollagen abgetrennt. Zum Schluß wurde die Haut noch zweimal mit eiskaltem destilliertem Wasser gewaschen. Für die Extraktion des säurelöslichen Kollagens wurde die Haut in 1 l 0,5 mol/l Essigsäure mit 0,03 % Toluol suspendiert und über Nacht bei 4 °C extrahiert. Die Extraktion wurde wiederholt und die vereinigten Extrakte 2 h bei 7.500 x g, 4 °C zentrifugiert. Zur Präzipitation des säurelöslichen Kollagens wurde nun der Überstand der Zentrifugation gegen 3 x 4 Liter 5 %ige (w/v) NaCl in 0,5 mol/l Essigsäure dialysiert. Das ausgefallene Kollagen wurde durch Zentrifugation (30 min mit 7.500 x g, 4 °C) abgetrennt und in 2-3 l 0,5 mol/l Essigsäure erneut aufgelöst.

Nach einer weiteren Dialyse über Nacht gegen 0,5 mol/l Essigsäure wurde das Kollagen durch Dialyse gegen 0,02 mol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (pH 7,4) präzipitiert. Der Puffer wurde dazu mehrmals gewechselt. Nach der anschließenden 30minütigen Zentrifugation mit 7.500 x g wurde das Pellet erneut in 2 l 0,5 mol/l Essigsäure aufgenommen. Eine anschließende Präzipitation erfolgte durch sukzessive Gabe von festem NaCl, bis eine Endkonzentration von 5 % (w/v) erreicht war. Nach der Sedimentation des Kollagens durch eine 30minütige Zentrifugation mit 7.500 x g wurde das erhaltene Pellet mehrmals mit 20 %iger (w/v) NaCl-Lösung gewaschen. Nach Lösung des Kollagens in 0,5 mol/l Essigsäure über Nacht folgte eine Ultrazentrifugation (1 h, 30.000 x g) zur Abtrennung der letzten nichtlöslichen Bestandteile. Der Überstand wurde gegen 0,1 mol/l Essigsäure dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Die Reinheit des Kollagens Typ I wurde mit der SDS-Gelelektrophorese nach Lugtenberg (2.17.2.2.1.6) überprüft. Die Ausbeute betrug 2,5 g.

Das Kollagen wurde als Lyophilisat bei -20 °C unter Ausschluß von Feuchtigkeit gelagert. Nach der Wiederauflösung des gelagerten Kollagens wurde jeweils die letzte Ultrazentrifugation

im beschriebenen Reinigungsverfahren zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wiederholt.

#### **2.17.2.2.2 Radioaktive Markierung des Kollagens durch Acetylierung mit $^3\text{H}$ -Essigsäureanhydrid**

Für die Markierung wurden 20 mg lyophilisiertes Kollagen (s. 2.17.2.2.2.1) über Nacht unter leichtem Rühren bei 4 °C in 10 ml 0,01 % (v/v) Essigsäure gelöst.

Kurz vor der Acetylierung wurde die Kollagenlösung mit 1 mol/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Lösung auf pH 8-9 titriert. 100  $\mu\text{Ci}$  des in Benzol gelösten  $^3\text{H}$ -Essigsäureanhydrids (spez. Aktivität: 100 mCi/mmol, 1 mCi/mg) wurden langsam in die gerührte Kollagenlösung getropft. Die Reaktion war ca. 1 h nach der letzten Essigsäureanhydridzugabe beendet.

Die Kollagenlösung wurde jetzt mit Eisessig wieder auf pH 4,0 zurücktitriert und anschließend so lange gegen 0,01 %ige Essigsäure dialysiert, bis die Radioaktivität im Dialysewasser auf die Untergrundstrahlung abgefallen war.

Das  $^3\text{H}$ -Kollagen wurde lyophilisiert und anschliessend bei -20 °C aufbewahrt.

Bei der radioaktiven Markierung von Kollagen mit  $^3\text{H}$ -Essigsäureanhydrid wurde folgendes Ergebnis erzielt:

---

Eingesetzte Menge an Kollagen	20 mg
Spezifische Aktivität des markierten Kollagens	$8,8 \times 10^5$ dpm/mg
Einbaurate des ( $^3\text{H}$ )- $\text{Ac}_2\text{O}$	8 %

---

Der Lysingehalt des Kollagens wurde nach Eastoe (1967) auf 4 % veranschlagt; damit ergibt sich ein Markierungsgrad von ca. 1 %, d.h., ca. 1 % aller  $\text{NH}_2$ -Gruppen sind acetyliert.

### **2.17.2.2.2.3 Isolierung von $^{14}\text{C}$ -Kollagen Typ I aus Rattenhaut**

Zur Gewinnung eines "in vivo" radioaktiv markierten Kollagen-Substrates wurde Ratten  $^{14}\text{C}$ -Glycin injiziert.

Fünf Ratten wurden insgesamt 250  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Glycin (spez. Akt. 126 mCi/mmol) intraperitoneal appliziert. Fünf Tage später wurden die Ratten getötet, rasiert und enthäutet.

Der weitere Aufarbeitungsgang der Kollagenisolierung wurde wie unter 2.17.2.2.2.1 beschrieben durchgeführt.

### **2.17.2.2.3 Vorschriften zur Aktivitätsbestimmung von Kollagenasen**

#### **2.17.2.2.3.1 Lederblau-Test**

Das Prinzip dieses Kollagenase-Tests beruht auf der Freisetzung von Peptid-gebundenem Farbstoff aus unlöslichem Lederpulver.

- 1) Enzympuffer  
0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,5, 0,15 mol/l NaCl, 0,005 mol/l  $\text{CaCl}_2$ , 0,2 % (w/v) BSA
- 2) Substratpuffer  
0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,5, 0,15 mol/l NaCl, 0,003 % Triton X 100
- 3) Enzymlösung  
1,67 mg Kollagenase, *Clostridium histolyticum*, Typ VII (Sigma) in 50 ml Enzympuffer
- 4) Substratlösung  
Hide-Power-Azure (Sigma), 50 mg/ml Substratpuffer

Zur Durchführung des Enzymtests werden folgende Lösungen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und im Anschluß daran 6 h bei 37 °C inkubiert:

Enzymlösung	30 $\mu\text{l}$
Substratlösung	150 $\mu\text{l}$
Inhibitorlösung	200 $\mu\text{l}$



Nach der Inkubation wird die Reaktion mit 1 ml eiskaltem Wasser abgestoppt und die Reaktionsgefäße nach Schütteln 10 min in einer Eppendorf-Zentrifuge (Mikrofuge 12, Beckman) zentrifugiert. Von dem Überstand wird die Extinktion bei 595 nm gegen den Leerwert (ohne Enzym) bestimmt.

#### 2.17.2.2.3.2 Synthetische Peptidsubstrate

Das Prinzip dieses Enzymtests beruht auf der Reaktion von Fluorescamin mit den durch proteolytische Spaltung von einem Peptidsubstrat freigesetzten Aminogruppen zu einer fluoreszierenden Verbindung. Für den Test werden folgende Lösungen verwendet:

- 1) Substratstammlösung: 500  $\mu\text{mol/l}$   
DNP-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Arg-NH<sub>2</sub>,  $M_r = 848$ , wird in einer Konzentration von 0,424 mg/ml in 0,1 mol/l Tris/HCl-Puffer, pH 7,6, der 0,005 mol/l CaCl<sub>2</sub> enthält, gelöst.
- 2) "Stoppuffer": 0,2 mol/l Phosphatpuffer, pH 6,8:  
0,2 mol/l Lösungen von NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in dest. Wasser werden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und eiskalt gelagert.
- 3) Fluorescamin-Reagenz: (0,36 mmol/l)  
10 mg Fluorescamin werden in 100 ml mit wasserfreiem CaCl<sub>2</sub> getrocknetem Aceton gelöst. Die Farbstofflösung kann mehrere Tage verwendet werden.

Nachfolgende Lösungen werden für den Enzymtest in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert:

35 $\mu\text{l}$	PMNL-Kollagenase
35 $\mu\text{l}$	Substratpuffer oder Inhibitorlösung
70 $\mu\text{l}$	Substratlösung
<hr/>	
140 $\mu\text{l}$	Gesamtvolumen

Vor Beginn der Inkubation werden dem Inkubationsansatz 40  $\mu\text{l}$  entnommen und mit 2 ml eiskaltem Stoppuffer versetzt. Der Testansatz wird dann 60 min bei 37 °C inkubiert und erneut ein 40- $\mu\text{l}$ -Aliquot mit 2 ml Stoppuffer versetzt. Zur Fluores-

zenzmarkierung werden die Proben dann mit 1 ml Fluorescamin-reagenz versetzt und nach kräftigem Schütteln sofort im Fluoreszenzphotometer gemessen: Anregung mit 390 nm, Emissionsmessung bei 475 nm. Als Spaltbreite wird für die Anregung 3 nm, für die Emission 10 nm gewählt. Die Differenz der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wird als relatives Maß für die Enzymaktivität eingesetzt.

#### **2.17.2.2.3.3 Bestimmung der Enzymaktivität bakterieller Kollagenase mit Kollagen als Substrat**

Das Prinzip dieses Enzymtests beruht auf der Reaktion von Fluorescamin mit den durch proteolytische Spaltung von Kollagen freigesetzten Aminogruppen zu einer fluoreszierenden Verbindung. Für den Test werden folgende Lösungen verwendet:

- 1) Enzym- und Substratpuffer  
0,1 mol/l Tris/HCl, pH 7,4, 0,05 mol/l  $\text{CaCl}_2$
- 2) Substratlösung: Kollagen (6,7  $\mu\text{mol/l}$ )  
Kollagen ( $M_r = 300.000$ ) aus Rattenhaut (s. 2.17.2.2.2.1) wird in einer Konzentration von 3 mg/ml in 0,2 mol/l Essigsäure über Nacht gelöst und anschließend gegen den oben angegebenen Tris-Puffer dialysiert. Durch Verdünnen mit dem gleichen Puffer wird eine Kollagenkonzentration von 2 mg/ml eingestellt. Zur Klärung der Lösung wird anschließend eine 1stündige Zentrifugation mit 23.000 x g durchgeführt.
- 3) Enzymlösung: bakterielle Kollagenase (14  $\mu\text{mol/l}$ )  
Als Stammlösung wird eine Lösung von *Clostridium histolyticum*-Kollagenase (EC 3.4.24.3) mit  $E_{280} = 0,14$  (ca. 0,1 mg/ml) in Tris-Puffer hergestellt.
- 4) "Stopppuffer": 0,2 mol/l Phosphatpuffer, pH 6,8:  
0,2 mol/l Lösungen von  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in dest. Wasser werden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt.
- 5) Fluorescamin-Reagenz: (0,36 mmol/l)  
10 mg Fluorescamin werden in 100 ml mit wasserfreiem  $\text{CaCl}_2$  getrocknetem Aceton gelöst. Die Farbstofflösung kann so mehrere Tage verwendet werden.

#### 6) Inhibitorlösungen

Jeder Inhibitor wird in einem kleinen Volumen (200-300 µl) Methanol oder Dioxan vorgelöst und dann mit 0,1 % (w/v) Triton X 100 auf das der gewünschten Konzentration entsprechende Volumen aufgefüllt.

Für den Enzymtest werden die nachfolgend aufgeführten Lösungen in ein eisgekühltes Eppendorf-Gefäß pipettiert:

75 µl	Kollagenasestammlösung, 1:1 mit Enzympuffer verdünnt
75 µl	Inhibitorlösung bzw. 0,1 % (w/v) Triton X 100 (als Kontrolle)
150 µl	Kollagenlösung
<hr/>	
300 µl	Gesamtvolumen

Aus den Eppendorf-Gefäßen werden zu Beginn zwei 40 µl Proben entnommen und in je 2 ml eiskalten Phosphatpuffer (0,2 mol/l), pH 6,8, gegeben. Nach der 3stündigen Inkubation bei 30 °C wird dieser Vorgang wiederholt.

Zur Fluoreszenzmarkierung werden die Proben mit 1 ml Fluorescamin-Reagenz versetzt und sofort kräftig geschüttelt. Die fluoreszierende Verbindung ist nur wenige Stunden stabil, deshalb wird die Bestimmung der Fluoreszenzintensität der Probe direkt durchgeführt.

Die Fluoreszenz wird mit der Wellenlänge  $\text{Ex } \lambda = 390 \text{ nm}$  angeregt, die Fluoreszenzemission bei  $\text{Em } \lambda = 475 \text{ nm}$  detektiert. Als Spaltbreite wird für die Anregung 3 nm, für die Emission 10 nm gewählt.

#### **2.17.2.2.3.4 Bestimmung der Aktivität der PMNL-Kollagenase mit radioaktiv markiertem Kollagen als Substrat**

##### *a) Fibrillentest nach Cawston und Barrett (1979)*

Dieser Enzymtest macht sich die Aggregationseigenschaften (Fibrillenbildung) des Kollagens zunutze. Nicht abgebautes Substrat wird nach der Inkubation in Gegenwart von Kollagenase abzentrifugiert, die Radioaktivität im Überstand (Spaltprodukte) stellt dann ein Maß für die Kollagenase-Aktivität dar. Für den Enzymtest werden nachfolgende Lösungen in ein

Eppendorf-Reaktionsgefäßen pipettiert und anschließend 20 h bei 37 °C inkubiert:

50-150 µl	Kollagenaselösung
50-150 µl	50 mmol/l Tris/HCl, pH 7,6,
	15 mmol/l CaCl <sub>2</sub> ,
100 µl	radioaktive Kollagenlösung
(aus 2.17.2.2.2.2 oder 2.17.2.2.2.3)	
	(1 mg/ml) in 50 mmol/l Tris/
	HCl, pH 7,6, 0,2 mol/l NaCl

---

300 µl Gesamtvolumen

Nach der Inkubation wird das Eppendorf-Gefäß 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert und von einer 200 µl-Probe des Überstandes die Radioaktivität bestimmt.

Als Kontrollproben werden Inkubationsansätze ohne Enzym bzw. mit 10 µg bakterieller Kollagenase (für den Totalabbau) parallel inkubiert.

*b) Fibrillentest nach Terato und Nagai (1976)*

Terato und Nagai inkubieren Enzym und radioaktiv markiertes Kollagen in Gegenwart von 1 mol/l Glucose. Glucose verhindert die Fibrillenbildung des Kollagens. Nach der Inkubation erfolgt die Trennung von Substrat und Spaltprodukten durch eine selektive Fällung des nativen Kollagens mit 50 % (v/v) Dioxan. Nach der Zentrifugation wird wiederum die Radioaktivität im Überstand bestimmt:

Radioaktives Kollagen (aus 2.17.2.2.2.2 oder 2.17.2.2.2.3) wird in einer Konzentration von 4 mg/ml in 0,005 mol/l Essigsäure gelöst. Diese Kollagenlösung wird mit dem gleichen Volumen 0,1 mol/l Tris/HCl-Puffer, pH 7,8, der 0,4 mol/l NaCl, 0,01 mol/l CaCl<sub>2</sub> und 1 mol/l Glucose enthält, versetzt.

200 µl Substratlösung werden mit dem gleichen Volumen der Enzymlösung über Nacht bei 35 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 µl 80 mmol/l 1,10-o-Phenanthrolin in 50 % (v/v) Dioxan gestoppt. Der Reaktionsansatz wird zur Denaturierung der Reaktionsprodukte noch weitere 60 min inkubiert.

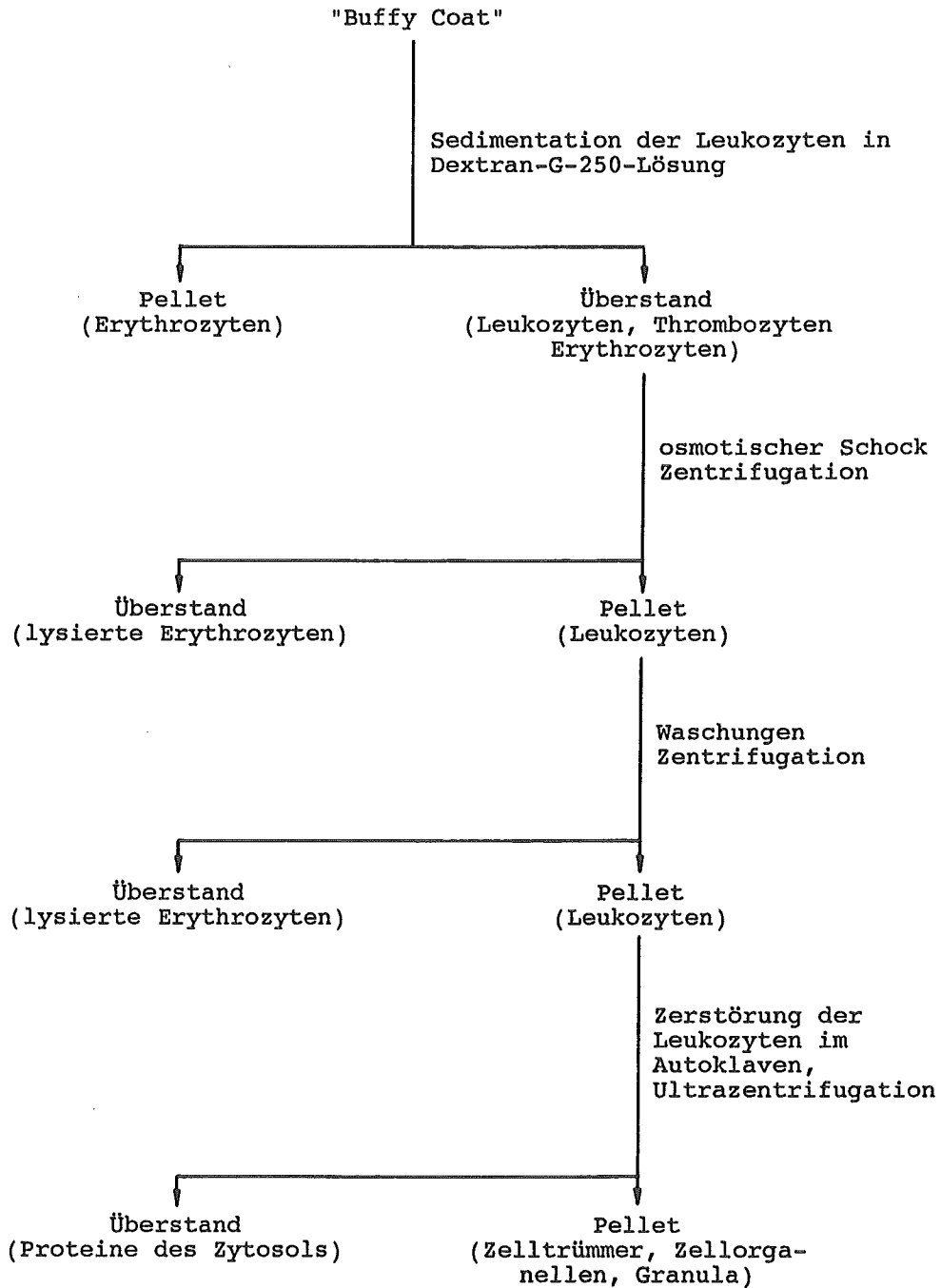
Anschließend werden 400 µl Dioxan der Lösung zupipettiert, die nach kräftigem Schütteln 10 min in der Beckman-Microfuge zentrifugiert wird. Von einer 500 µl-Probe des Überstandes wird die Radioaktivität bestimmt.

Die Enzymaktivität der Kollagenase wird wie folgt definiert: eine Einheit (U) entspricht der Enzymmenge, die in einer Stunde bei 35 °C 1 µg radioaktiv markiertes Kollagen hydrolysiert. Die Menge des hydrolysierten Kollagens wird durch Radioaktivitätsmessung im Szintillationszähler bestimmt.

### ***2.17.3 Ergebnisse und Diskussion***

#### ***2.17.3.1 Isolierung und Reinigung von Kollagenase aus polymorphkernigen Leukozyten***

Die Isolierung und Reinigung der PMNL-Kollagenase wurde mit den unter 2.17.2.2.1.1-7 beschriebenen Methoden durchgeführt. Sie umfaßte eine Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration und Affinitätschromatographie an Kollagen-Sepharose. Das experimentelle Vorgehen ist in den Übersichtsschemata der Abbildungen 2.38 - 2.40 dargestellt.



*Abb. 2.38: Präparation der Granula und anderer subzellulärer Strukturen aus polymorphkernigen Leukozyten*

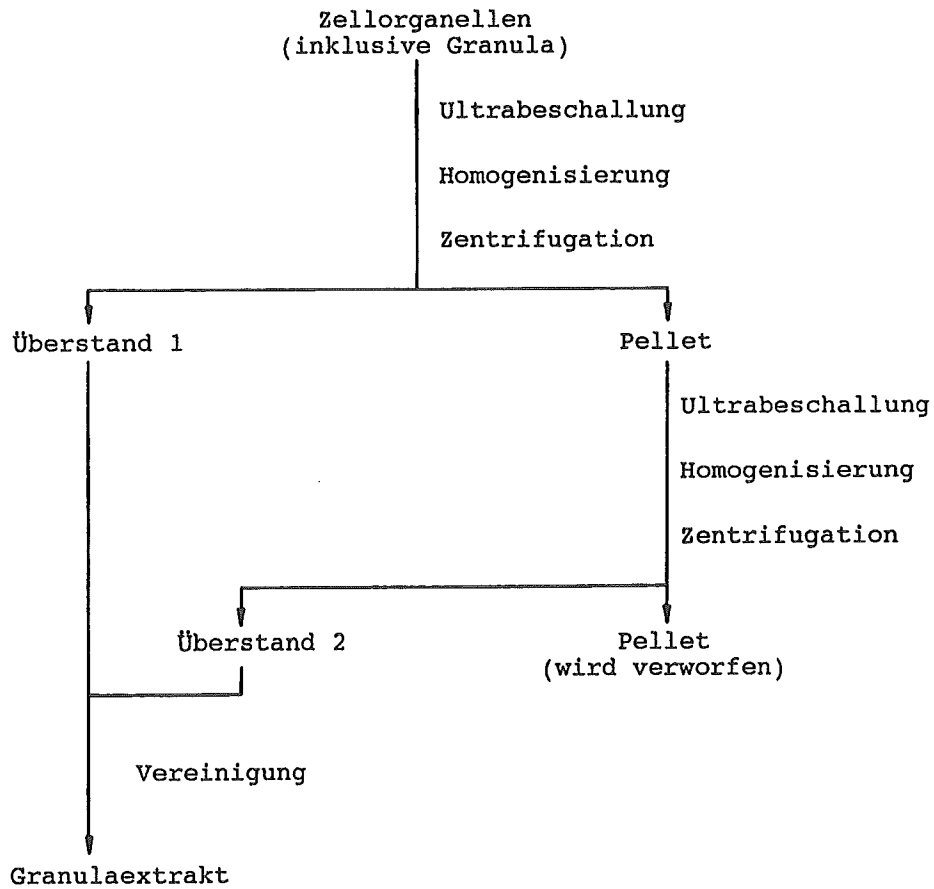
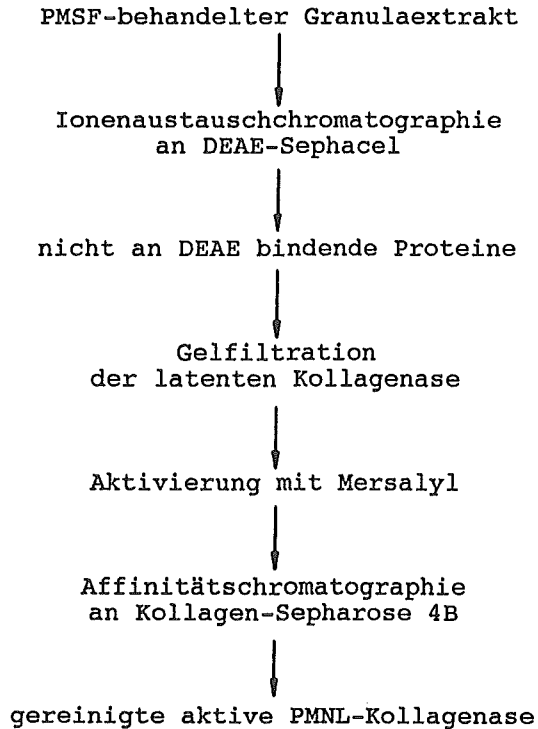


Abb. 2.39: Extraktion der Enzyme aus Granula und anderen subzellulären Strukturen



*Abb. 2.40 Reinigung der PMNL-Kollagenase*

Ausgangsmaterial für die Reinigung der Kollagenase waren polymorphkernige Leukozyten, welche aus "Buffy Coat" gewonnen wurden. Nach der Freisetzung der Enzyme aus den Granula ist die sofortige Inhibition der Serin-Proteasen Elastase und Kathepsin G mit PMSF besonders wichtig, da hier nicht näher beschriebene Vorversuche zur Stabilität latenter und aktiver Kollagenase gegenüber Elastase zeigten, daß beide Kollagenasen gleichermaßen empfindlich auf die proteolytische Einwirkung von Elastase reagieren. Bei einer Inkubation äquimolarer Mengen von Kollagenase und Elastase bei 37 °C ist schon nach 15 min ein Verlust der Kollagenase-Aktivität von etwa 60 % zu verzeichnen. Nach Murphy (1980) befinden sich in den azurophilen Granula "hohe Konzentrationen" Elastase und Kathepsin G.



Bei der anschliessenden Ionenaustauschchromatographie erfolgte eine Trennung von latenter und aktiver Kollagenase, da nur die aktive Form an das DEAE-Sephacel gebunden wird. Bei den ersten Reinigungsversuchen wurde die Kollagenase bereits nach der Behandlung mit PMSF durch Mersalyl aktiviert. Eine Aktivierung zu diesem Zeitpunkt ist jedoch verfrüht, da das Enzym dann zusammen mit großen Mengen Fremdprotein (ca. 90 % des aufgetragenen Proteins) an DEAE-Sephacel gebunden würde. Die Detektion des Enzyms im Eluat des mit einem Salzgradienten eluierten DEAE-Sephacels erwies sich wegen der äußerst geringen Enzymkonzentrationen als sehr schwierig. Für die weitere Reinigung der Kollagenase wurde daher ausschließlich das nicht an DEAE-Sephacel bindende latente Enzym verwendet und die Aktivierung erst vor der Affinitätschromatographie an Kollagen-Sepharose durchgeführt.

Mit dem nicht an DEAE-Sephacel gebundenen Protein wurde nach Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration eine Gelfiltration an Sephacryl S 200 durchgeführt. Um die Position der Kollagenase im Elutionsdiagramm zu ermitteln, wurde die Säule mit zwei geeigneten Marker-Proteinen (Phosphorylase b,  $M_r = 94.000$  und Rinderserumalbumin  $M_r = 67.000$ ) geeicht. Die Fraktionen dieses Molekulargewichtsbereiches wurden auf Kollagenase-Aktivität nach Cawston und Barrett (1979) geprüft, wobei die Spaltung des Kollagens mit Hilfe des SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen wurde (siehe auch Abb. 2.44). Die Variante des Kollagenase-Aktivitätstests nach Terato und Nagai (2.17.2.2.3.4b) erwies sich für die Detektion des relativ geringen Kollagenase-Aktivitäten als zu unempfindlich.

Das in Abbildung 2.41 dargestellte Elutionsprofil der latenten Kollagenase nach Gelfiltration an Sephacryl S200 zeigt, daß die Kollagenase deutlich von der größten Menge enzymatisch nicht-aktiven Proteins abgetrennt wurde.

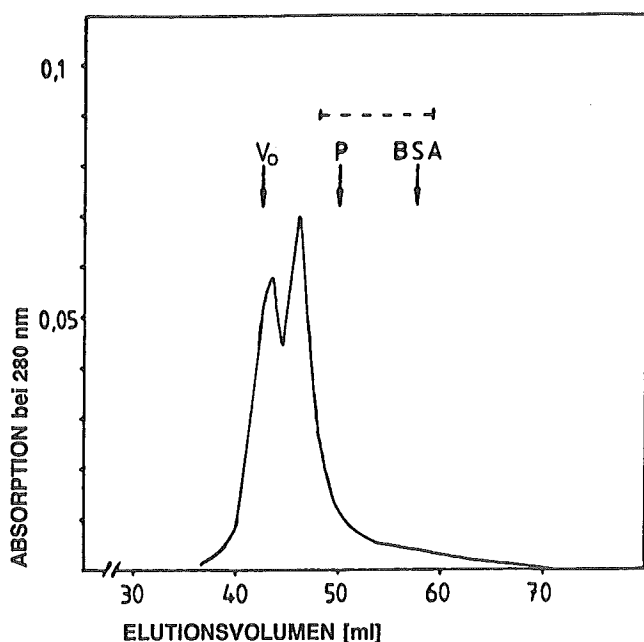


Abb. 2.41: Ein repräsentatives Elutionsprofil der Kollagenase nach Gelfiltration an Sephacel S 200.

Säule: 1,6 x 75 cm

Mobile Phase: 0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,6,  
0,5 mol/l NaCl,  
0,005 mol/l  $\text{CaCl}_2$

Flußrate: 5 ml/h

P: Phosphorylase b:  $M_r=94.000$

BSA: Rinder Serum-Albumin:  $M_r=67.000$

---- Fraktionen mit Kollagenase-Aktivität

Die Kollagenase-Aktivität enthaltenden Fraktionen der Gelfiltration wurden nach Konzentrierung durch Ultrafiltration und Aktivierung mit Mersalyl affinitätschromatographisch an Kollagen-Sephrose gereinigt. Die Aktivierung des Enzyms ist erforderlich, da nur die aktive Kollagenase an die Kollagen-Sephrose-Matrix bindet. Bei der Elution der Kollagenase mit Puffer erhöhter Ionenstärke wurde nicht fraktioniert, da eine Detektion des Enzymproteins durch Absorption bei 280 nm wegen der geringen Enzymkonzentration nicht möglich ist. Nach Konzentrierung durch Ultrafiltration wurde die Kollagenase-Präparation mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese nach Lugtenberg et al. (s. 2.17.2.2.1.6) charakterisiert. Die relative Molekülmasse der

PMNL-Kollagenase wurde von Murphy (1980) mit  $M_r = 68.000$  (Gelfiltration an Ultrogel Aca 34) und von Macartney (1983) mit  $M_r = 64.000$  (SDS-PAGE) angegeben. Die molare Masse unserer Enzympräparation wurde mit 65.000 g/mol bestimmt (Abb. 2.42). Als Referenzsubstanz wurde eine Eichproteinmischung für den Molekulargewichtsbereich von  $M_r = 20.100 - M_r = 94.000$  eingesetzt (Abb. 2.43).

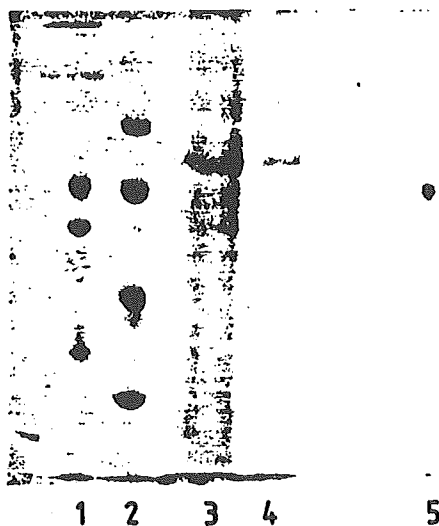


Abb. 2.42: SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lugtenberg et al. (1975)

SDS-PAGE: Trenngel: %T = 10,1, %C = 2,0;  
Sammelgel: %T = 3,0, %C = 2,6

Proben: 1. Kalibrationskit HMW  
2. Kalibrationskit LMW  
3. Nach Ammoniumsulfatfällung  
4. DEAE-Eluat  
5. aktive Kollagenase nach Affinitätschromatographie an Kollagen-Sephrose

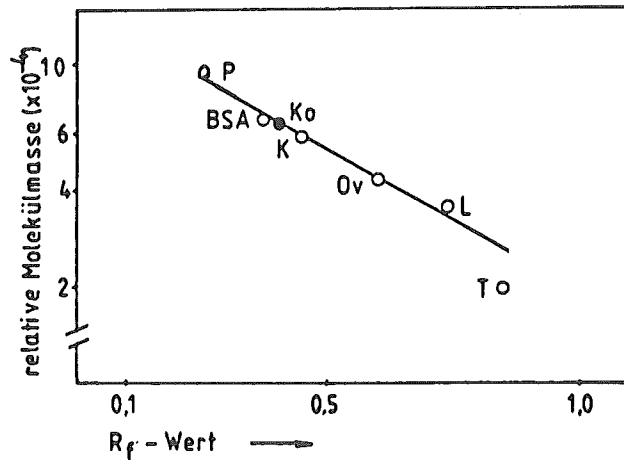


Abb. 2.43: Standardkurve zur Molekularmassenbestimmung nach der Methode nach Weber und Osborn, 1969

Kalibrierungsproteine (o):

Phosphorylase b (P)	$M_r = 94.000,$
Rinderserum-Albumin (BSA)	$M_r = 67.000,$
Katalase (K)	$M_r = 60.000,$
Ovalbumin (Ov)	$M_r = 43.000,$
Laktatdehydrogenase (L)	$M_r = 36.000,$
Trypsininhibitor (T)	$M_r = 20.100,$
PMNL-Kollagenase (●)	Ko

Zum Nachweis der für Säugetierkollagenasen typischen Spaltung von Kollagen in ein  $3/4$  großes  $TC_A$ - und ein  $1/4$  großes  $TC_B$ -Stück, wurde Kollagen mit der gereinigten PMNL-Kollagenase inkubiert. Das beobachtete charakteristische Bandenmuster (Abb. 2.44) zeigt, daß es sich bei der gewonnenen einheitlichen Proteinfraction tatsächlich um ein kollagenolytisches Enzym handelt. Tabelle 2.35 faßt die Ausbeuten der verschiedenen Reinigungsschritte einer typischen Kollagenasepräparation zusammen.

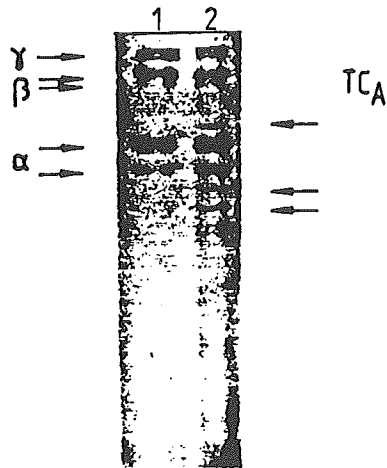


Abb. 2.44: SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Kollagen  
 Typ I nach enzymatischem Abbau mit PMNL-Kollagenase  
 SDS-PAGE: Trenngel: %T = 7,7, %C = 2,6  
 Sammelgel: %T = 3,1, %C = 2,6  
 Proben:  
 1. Kollagen Typ I  
 2. Kollagen Typ I nach Inkubation mit  
 PMNL-Kollagenase

Tab. 2.35: Reinigung der Kollagenase aus PMN-Leukozyten

Die Präparation der Kollagenase erfolgte wie in den Schemata der Abb. 2.38-2.40 beschrieben. Die Bestimmung der Enzymaktivität basierte auf der Methode von Terato et al. (1976). 0,2 ml der Lösung von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Kollagen, welche 1 mol/l Glukose enthielt, wurde mit 0,2 ml der Enzympräparation bei 35 °C für verschiedene Zeiträume inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zusatz von 20 µl einer 80 mmol/l o-Phenanthrolinlösung (gelöst in 50 Vol% Dioxan) und einer anschliessenden 60minütigen Inkubation bei 35 °C gestoppt. Bei Raumtemperatur (22-28 °C) wurden die Degradationsprodukte nach Zusatz von 0,4 ml Dioxan und kräftigem Schütteln extrahiert, bei 3000 x g für 10 Min. zentrifugiert und die Radioaktivität von 0,5 ml des Überstandes nach Zusatz von 10 ml Szintillator (Instagel II, Packard, Frankfurt) im Flüssigszintillationszähler quantifiziert. Eine Einheit (U) ist definiert als die Menge Enzym, welche 1 µg  $^{14}\text{C}$ -Kollagen in 1 h bei 35 °C hydrolysiert. Die Proteinbestimmung erfolgte mit der Methode nach Lowry et al. (1951).

Reinigungs- schritt	Gesamt- protein [mg]	Aktivität [mU]	spezifische Aktivität [mU/mg]	Reinigungs- faktor
Granulozyten- extrakt	220	263	1,2	1
DEAE-Eluat	24,2	190	7,9	7
S 200-Eluat	1,4	170	121	100
Kollagen-Sepha- roseeluat	0,4	169	423	350

### 2.17.3.2 Aktivitätstests und Ergebnisse zur PMNL-Kollagenase

Die beschriebenen Testverfahren zur Kollagenase-Aktivitätsbestimmung mittels Lederblau als Substrat wurden schon seit langer Zeit für das Screening potentieller Inhibitoren eingesetzt (s. 2.17.2.2.3.1). Da die Prüfung aber routinemäßig mit bakterieller Kollagenase durchgeführt wurde, stellt sich die Frage, ob Inhibitoren dieses Enzyme zwangsläufig auch Hemmer des Enzyms aus polymorphkernigen Leukozyten sind, welches für die Bindegewebs- und Knorpeldestruktion bei rheumatoiden Arthritiden verantwortlich ist. Aus diesem Grund war es

notwendig, Kollagenase aus polymorphkernigen Leukozyten zu gewinnen, zu reinigen und einige im Routinescreening als inhibitorisch wirksam befundene Verbindungen auf ihren Einfluß auf das Leukozyten-Enzym hin zu untersuchen. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

Unbedingte Voraussetzung für die Reinigung eines Enzyms ist das Vorhandensein eines spezifischen und reproduzierbare Ergebnisse liefernden Aktivitätstests. Die bisher für Kollagenasen in der Literatur beschriebenen Methoden der Aktivitätsbestimmung, die auf der Spaltung von Kollagen, chemisch modifiziertem Kollagen oder synthetischen Oligopeptiden und anschließender Quantifizierung der Hydrolyseprodukte beruhen, wurden daher unter den eben genannten Gesichtspunkten einer kritischen Prüfung unterzogen. Für die Prüfung von Kollagen auf Brauchbarkeit als Substrat wurden zwei auf unterschiedliche Art und Weise radioaktiv markierte Kollagen-Präparationen im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Fibrillenbildung miteinander verglichen. Sowohl das mit  $^3\text{H}$ -Acetanhydrid acetylierte Kollagen als auch das in vivo durch Inkorporation von  $^{14}\text{C}$ -Glycin radioaktiv markierte Kollagen zeichneten sich durch eine sehr schlechte Fibrillenbildung aus, so daß nicht hydrolysiertes Kollagen und Kollagen-Spaltprodukte sich durch Zentrifugation nicht ausreichend voneinander trennen ließen. Dieses Phänomen ist literaturbekannt (Harris und Vater, 1980). Gisslow und McBride (1975) und Terato et al. (1976) entwickelten Verfahren für die selektive Präzipitation des nicht hydrolysierten Kollagens. Die Präzipitation mit Phosphorwolframsäure erwies sich allerdings nur für die Assays mit bakterieller Kollagenase als brauchbar, da die beiden größeren Kollagen-Bruchstücke, die durch Katalyse der PMNL-Kollagenase entstehen, ebenfalls präzipitiert werden. Bei der Fällung mit Dioxan (s. 2.17.2.2.3.4b) blieben die Spaltprodukte jedoch nach Zentrifugation im Überstand, so daß diese Präzipitationsmethode für die Bestimmung der Aktivität der PMNL-Kollagenase während der Isolierung und Reinigung angewendet wurde.

Da die bisher synthetisierten literaturbekannten Oligopeptid-Substrate der Kollagenase keine helikale Struktur besitzen und somit auch durch andere Proteasen - z.B. Gelatinase (J. Fedrowitz, Universität Bielefeld, persönliche Mitteilung) -

gespalten werden können, sind diese Substrate ausschließlich für Untersuchungen mit gereinigter Kollagenase geeignet. Beide geprüften Peptide der Struktur DNP-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Arg-NH<sub>2</sub> und Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg erwiesen sich als durch bakterielle Kollagenase spaltbar, während durch die PMNL-Kollagenase nur das zuerst genannte Peptid hydrolysiert werden konnte (s. 2.17.2.2.3.2).

Von den im Screening mit bakterieller Kollagenase und Lederblau gefundenen Inhibitoren wurden exemplarisch drei herausgegriffen, um die Frage zu beantworten, ob Inhibitoren der Clostridium-histolyticum-Kollagenase auch gleichzeitig Inhibitoren der PMNL-Kollagenase sind. Tabelle 2.36 zeigt die inhibitorische Wirkung von Ebselen, NAT 02-634 und NAT 02-636 auf die Kollagenase-katalysierte Hydrolyse von Lederblau. Da Lederblau aufgrund seiner polymeren Struktur und Unlöslichkeit nur ungenügende Qualitäten als Substrat aufweist - keine definierten Substratkonzentrationen, Notwendigkeit langer Inkubationszeiten -, können mit diesem Substrat keine Aussagen über die Art der Inhibition gemacht werden. Untersuchungen mit Kollagen bzw. dem synthetischen Peptid der Struktur Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg zeigten, daß NAT 02-634 und NAT 02-636 kompetitive Inhibitoren der bakteriellen Kollagenase sind. Gegenüber Kollagen als Substrat wurde für NAT 02-634 eine Inhibitionskonstante von 30-35 µmol/l, für NAT 02-636 ein K<sub>i</sub>-Wert von 25-30 µmol/l ermittelt; in Gegenwart des synthetischen Peptids als Substrat betrugen die K<sub>i</sub>-Werte 75 bzw. 82 µmol/l. Für NAT 02-634 sind die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen in der Abbildungen 2.45 und 2.46 dargestellt.

Da der Inhibitionstyp von Ebselen bei Verwendung von Kollagen als Substrat nicht eindeutig ermittelt werden konnte, wurden die meisten Untersuchungen mit dem synthetischen Peptid der eben genannten Struktur gemacht. Dabei zeigte Ebselen ein völlig unerwartetes Verhalten: Bis zu einer Inhibitorkonzentration von 100 µmol/l wurde kaum eine Inhibitionswirkung beobachtet. Erst nach einer 20minütigen Vorinkubation von bakterieller Kollagenase und Inhibitor bei 30 °C entwickelte sich die maximale Hemmwirkung des Ebselens (Abb. 2.47). Daher wurden für die folgenden Untersuchungen Enzym und Inhibitor vor der Aktivitätsbestimmung 20 min bei 30 °C vorinkubiert.



Die Abbildung 2.48 zeigt in einem Lineweaver-Burk-Diagramm den Substrateinfluß auf die Inhibitionswirkung von Ebselen. Der Verlauf der Geradenschar weist auf den Typ einer nichtkompetitiven Hemmung hin, da der  $K_i$ -Wert nahezu konstant blieb und  $v_{max}$  kleiner wurde. Vermutungen, daß die Inhibition auf einer Reaktion von Ebselen mit einer SH-Gruppe des Enzyms beruht, konnten nicht bestätigt werden. Das Ebselen-inhibierte Enzym ist durch Gelfiltration wieder voll reaktivierbar; die Elektronenspektren des Ebselens zeigten nicht die charakteristischen Veränderungen die nach Reaktion von Ebselen mit einem Mercaptan auftreten.

Um zu prüfen, ob die drei genannten und charakterisierten Inhibitoren der *Clostridium-histoliticum*-Kollagenase auch inhibitorische Aktivität gegenüber der PMNL-Kollagenase aufwiesen, wurden diese Substanzen bis zu einer Konzentration von 1 mmol/l in Gegenwart von gereinigter PMNL-Kollagenase und dem Peptid der Struktur DNP-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Arg-NH<sub>2</sub> inkubiert und die Hydrolysegeschwindigkeit durch Bestimmung der freigesetzten Aminogruppen mit Hilfe von Fluorescamin bestimmt. Alle 3 Substanzen zeigten keinerlei inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der PMNL-Kollagenase. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die im Screening gefundenen Inhibitoren der bakteriellen Kollagenase nicht auch automatisch Inhibitoren der PMNL-Kollagenase sind. Das bedeutet, daß nur unter Verwendung von PMNL-Kollagenase bei der ersten orientierenden Prüfung von Substanzen wirksame Verbindungen gefunden werden können.

**Tab. 2.36: Inhibition der Aktivität von Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* durch Ebselen, NAT 02-634 und NAT 02-636**

Alle Experimente wurden wie von Rinderknecht et al. (1968), beschrieben durchgeführt. 15 mg Lederblau wurden mit den angegebenen Substanzkonzentrationen in Gegenwart von 0,1 Einheiten des Enzyms in 0,05 ml/l Tris Puffer (pH 7,4), welcher 5 % Methanol, 0,1 % Polyenylphosphatidylcholin und 0,15 mol/l  $\text{CaCl}_2$  enthielt, 6 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die Absorption des Überstandes bei 595 nm in einem Spektralphotometer (Beckman, Modell 34) bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

Substanz	Konzentration [mol/l]	Inhibition [% vs. Kontrolle]
NAT 02-634	100	94,0
	30	89,7
	10	57,2
NAT 02-636	100	92,5
	30	87,6
	10	57,6
Ebselen	100	49,3
	30	12,7
	10	0,5

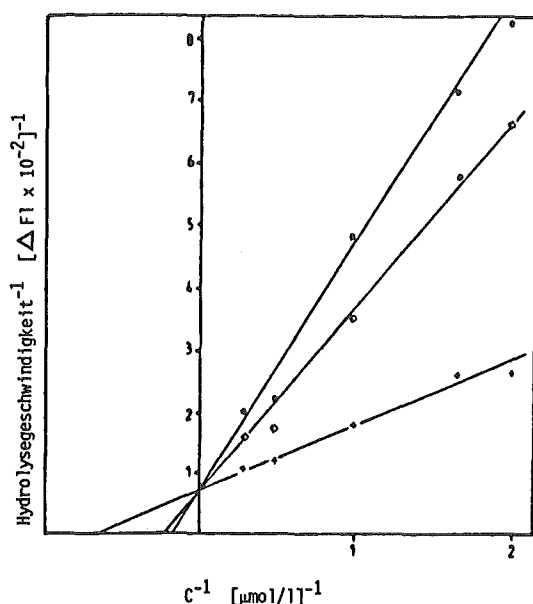


Abb. 2.45: Graphische Auftragung der enzymatischen Kollagenhydrolyse in Gegenwart von NAT 02-634 nach Lineweaver-Burk.

Kollagen Typ I wurde in 0,2 mol/l Essigsäure gelöst (3 mg/ml) und anschliessend gegen 0,1 mol/l Tris/HCl, 0,05 mol/l CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4, dialysiert. Die Konzentration des Kollagens wurde auf 2 mg/ml mit selbigem Puffer eingestellt und in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Die Kollagenlösungen wurden mit 75  $\mu$ l Kollagenaselösung (*Clostridium histolyticum*, 7  $\mu$ mol/l in obigem Puffer) und 75  $\mu$ l Inhibitorlösung, welche 0,1 % Triton X-100 (Endkonzentration in 300  $\mu$ l) enthielt, 3 h bei 30 °C inkubiert. Die anschliessende Fluoreszenzmarkierung von jeweils 40  $\mu$ l der Proben erfolgte durch Zusatz von 1 ml Fluorescaminlösung (0,1 mg/ml Aceton). Die Fluoreszenz wurde nach Anregung bei 390 nm bei einer Emissionswellenlänge von 475 nm bei 20 °C bestimmt.

0  $\mu$ mol/l NAT 02-634 ( + )  
 50  $\mu$ mol/l NAT 02-634 ( ◇ )  
 100  $\mu$ mol/l NAT 02-634 ( ● )

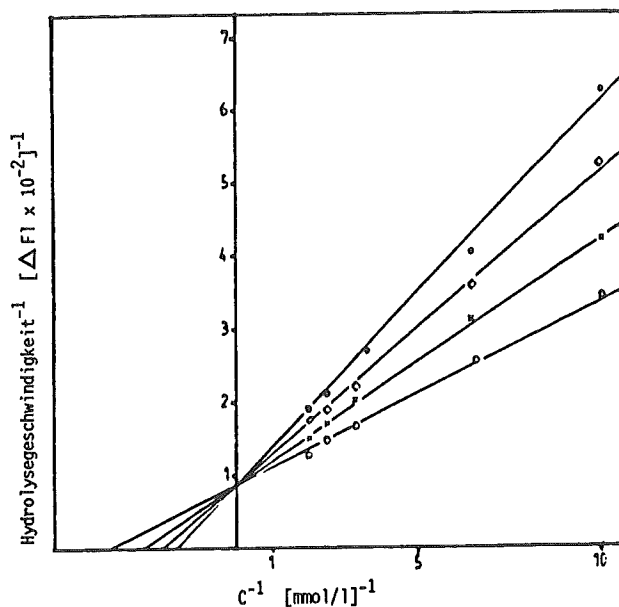


Abb. 2.46: Graphische Auftragung der enzymatischen Hydrolyse des synthetischen Peptids Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg in Gegenwart von NAT 02-634 nach Lineweaver-Burk. Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zur Abb. 2.45 beschrieben, durchgeführt, wobei das synthetische Peptid als Substrat diente (1 mmol/l) und die Konzentration der Kollagenaselösung 1 μmol/l bei einer Inkubationszeit von 5 Min. betrug.

0 μmol/l NAT 02-634 ( ○ )  
 25 μmol/l NAT 02-634 ( + )  
 50 μmol/l NAT 02-634 ( □ )  
 100 μmol/l NAT 02-634 ( ● )

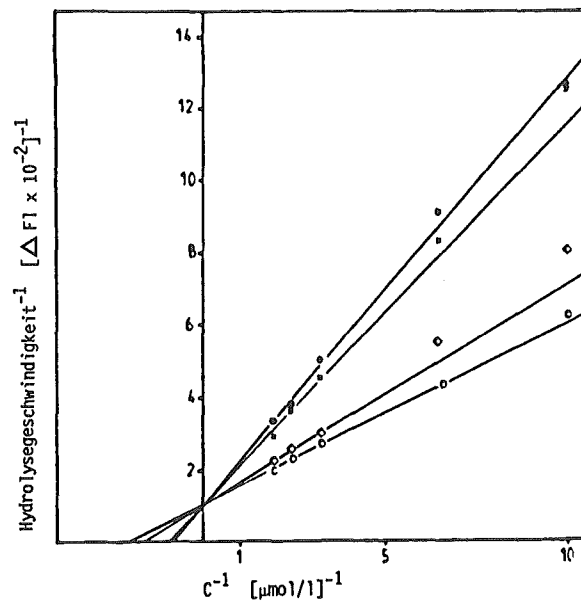


Abb. 2.47: Graphische Auftragung der enzymatischen Hydrolyse des synthetischen Peptids Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg in Gegenwart von Ebselen nach Lineweaver-Burk. Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zur Abb. 2.46 beschrieben, durchgeführt, wobei das Enzym mit  $50 \mu\text{mol/l}$  Ebselen für die angegebenen Zeiten vorinkubiert wurde.

Kontrolle ohne Ebselen ( ○ )

0 Min. ( □ )

10 Min. ( + )

20 Min. ( ● )

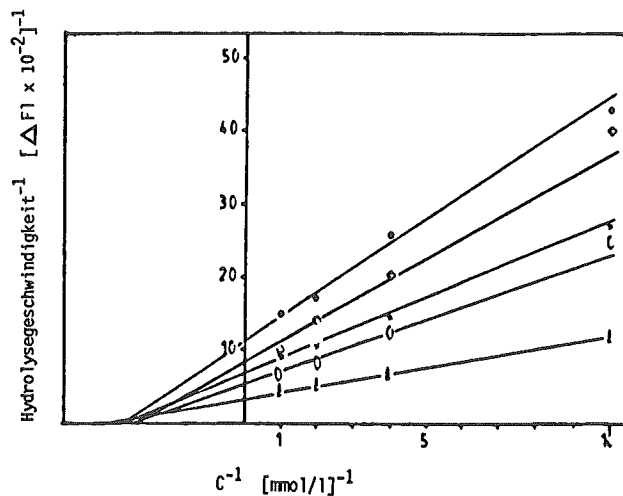


Abb. 2.48: Graphische Auftragung der enzymatischen Hydrolyse des synthetischen Peptids Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg in Gegenwart von Ebselen nach Lineweaver-Burk. Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zur Abb. 2.46 beschrieben, durchgeführt, wobei das Enzym mit den angegebenen Ebselenkonzentrationen 20 min vorinkubiert wurde.

- 0  $\mu mol/l$  Ebselen ( $\Delta$ )
- 25  $\mu mol/l$  Ebselen ( $\circ$ )
- 50  $\mu mol/l$  Ebselen (+)
- 100  $\mu mol/l$  Ebselen ( $\square$ )
- 200  $\mu mol/l$  Ebselen ( $\bullet$ )

## **2.18 Inhibition der Elastase aus polymorphkernigen (PMN-) Leukozyten**

### **2.18.1 Prinzip des Testverfahrens**

Neben anderen Proteasen katalysiert die Elastase die Spaltung von unlöslichem Lederstaub mit kovalent gebundenem Farbstoff. Die Konzentration an freigesetztem Peptid-gebundenen Farbstoff, die sich nach Zentrifugation photometrisch bestimmen läßt, ist ein Maß für die proteolytische Aktivität des Enzyms, die in Gegenwart von Inhibitoren herabgesetzt ist (Methode nach Rinderknecht et al., 1968). Zur Beurteilung der Inhibitorwirkung dient die Inhibitorkonzentration, bei der die Enzymaktivität zu 50 % gehemmt wird ( $IC_{50}$ -Wert), wobei die Auswertung der Ergebnisse rechnerisch nach einem selbst erstellten Programm erfolgt.

Der Test erlaubt das Auffinden von inhibitorisch wirksamen Substanzen, macht aber keine Aussage über die Art und Spezifität der Inhibitoren möglich. Elastase-Inhibitoren könnten u.a. bei chronischen Gelenksentzündungen das Ausmaß der Bindegewebs- und Knorpeldestruktion durch Leukozyten- und Synovialzellen-Proteasen herabsetzen.

### **2.18.2 Material und Methoden**

#### **2.18.2.1 Material**

##### **a) Geräte**

- Elektrophoreseapparaturen:

##### **a) SDS-Gelelektrophorese:**

LKB 2001 Elektrophoresekammer (LKB, Bromma, Schweden)

##### **b) Hochspannungsgerät:**

LKB 2197 Power Supply (LKB, Bromma, Schweden)

- Geräte für Säulenchromatographie:

##### **a) Fraktionsammler:**

LKB 7000 Ultrorac (LKB, Bromma, Schweden)

##### **b) Optische Einheit:**

LKB 2089 UV Cord II (LKB, Bromma, Schweden)

c) Pumpen:

Abimed, Minipuls 2 (Abimed, Düsseldorf)  
Microperpex 2132 (LKB, Bromma, Schweden)

- pH-Meßgerät und Zubehör:

Beckman Digital-pH-Meter Modell 3500  
Einstabmeßkette Beckman Nr. 39520

- Spektrophotometer:

Beckman Spektrophotometer, Modell 34 (Beckman, München)

- Szintillationszähler:

Packard 300 C (Packard, Frankfurt a. M. )  
LKB Modell 1219 (Pharmacia/LKB, Freiburg)

- Ultraschallgerät:

Sonifier B-12 (Branson, Danburg, USA)

- Zentrifugen:

- a) Kühlzentrifuge Beckman J2-21 (Beckman, München)
- b) Ultrazentrifuge Beckman L8-70M (Beckman, München)
- c) Tischzentrifuge Labofuge 6000 (Heraeus, Hanau)

- Ultrafiltrationsgeräte:

- a) Minicon Mikrokonzentratoren (Amicon, Witten)
- b) Amicon Ultrazentrifugationszelle mit den Membranen:
  - YM 10    Ausschußgrenze 10.000
  - YM 30    Ausschußgrenze 30.000

b) Chemikalien:

Acrylamid, reinst	Serva (Heidelberg)
Ammoniumperoxodisulfat	Serva (Heidelberg)
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	Pharmacia (Freiburg)
Calciumchlorid p.a.	Merck (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva (Heidelberg)
Concanavalin-A Sepharose	Pharmacia (Freiburg)
Citronensäure p.a.	Merck (Darmstadt)
DEAE-Sephacel	Pharmacia (Freiburg)
Dextran G-250	Serva (Heidelberg)
Eichproteingemische HMW + LMW	Pharmacia (Freiburg)
Elastin	Sigma (Taufkirchen)
Fluorescamin	Sigma (Taufkirchen)



Glycin p.a.	Merck (Darmstadt)
Harnstoff p.a.	Serva (Heidelberg)
Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
1-O-Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid	Sigma (Taufkirchen)
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva (Heidelberg)
Sephacryl S-200, S-300	Pharmacia (Freiburg)
SDS reinst	Serva (Heidelberg)
TEMED	Serva (Heidelberg)
Trichloressigsäure	Riedel De Haen (Seelze)
Tris	Merck (Darmstadt)

## 2.18.2.2 Methoden

### 2.18.2.2.1 Gewinnung von PMN-Leukozyten

Bei der Isolierung von Leukozyten nach Ohlsson K. (1971) wird von einem Leukozytenkonzentrat, dem sogenannten "Buffy Coat", ausgegangen. "Buffy Coat" ist ein Überstand, der aus venösem Frischblut nach vorsichtiger Zentrifugation erhalten wird. Die Blutgerinnung wird dabei durch 10 %igen Zusatz (v/v) einer Citratlösung (3,8 %ig an Citronensäure in 0,15 mol/l NaCl) verhindert.

Zur Isolierung der Leukozyten werden die Erythrozyten sedimentiert. Dazu wird das "Buffy Coat" mit dem gleichen Volumenteil eiskalter isotonischer Kochsalzlösung, die 3 % (w/v) Dextran G-250 enthält, gemischt. Nach einer einstündigen Sedimentation der Erythrozyten bei 4 °C wird das überstehende Plasma mit den Leukozyten abgenommen und 8 Minuten mit 600 x g bei 4 °C (J2-21-Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Die im Sediment verbleibenden Resterythrozyten werden durch Zugabe von 100 ml eiskalter 0,03 mol/l NaCl-Lösung hämolysiert. Nach 20 sec wird zur Wiederherstellung der Isotonie mit 100 ml eiskalter NaCl-Lösung (0,28 mol/l) versetzt und erneut zentrifugiert (10 min mit 400 x g bei 4 °C). Dieser Vorgang der osmotischen Lyse wird dreimal wiederholt, wobei die Leukozyten anschliessend frei von kontaminierenden Erythrozyten sind.

Zum Abschluß der Reinigung werden die Leukozyten noch viermal mit eiskalter 0,9 %iger (w/v) NaCl-Lösung gewaschen. Nach

jedem Waschvorgang wird 5 Minuten bei 4 °C mit 110 x g zentrifugiert.

#### **2.18.2.2.2 Isolierung und Extraktion lysosomaler Granula aus PMN-Leukozyten**

Die weitere Aufarbeitung der PMN-Leukozyten erfolgt nach einer Methode von Tschesche H. et al. (pers. Mitteilung).

Die PMN-Leukozyten werden in Tris/HCl (0,05 mol/l), pH 7,4, NaCl (0,15 mol/l), KCl (0,025 mol/l) und MgCl<sub>2</sub> (0,005 mol/l) im Verhältnis Puffer : Pellet = 5 : 1 (Engelbrecht et al. 1982) resuspendiert. Die Zellsuspension wird in einem Autoklaven oder einer Parr-Bombe für 15 min unter einem Druck von 4,8-5,5 MPa (48-55 bar) gesetzt. Nach schnellem Ablassen des Druckes wird anschließend zur Abtrennung der Granula, Zellkerne und Mitochondrien von den zytoplasmatischen Proteinen ultrazentrifugiert (L8-70M Ultrazentrifuge, 4 h bei 48.000 x g, 4 °C).

Das Pellet wird nun zweimal mit Citratpuffer (0,02 mol/l), pH 6,0, CaCl<sub>2</sub> (0,005 mol/l), ZnCl<sub>2</sub> (0,5 mol/l) und 0,05 % (w/v) Brij 35 extrahiert. Die Extraktion beinhaltet die Kombination von Beschallung und Homogenisation. Nach dem Beschallen (3 min über einen Zeitraum von 6 min verteilt) werden die subzellulären Strukturen in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert (10 Hube). Nach einer zweiten Beschallung wird mit 48.000 x g bei 4 °C zentrifugiert (L8-70M Ultrazentrifuge) und der unlösliche Rückstand einer zweiten Extraktionsprozedur unterzogen. Diese wird analog zur ersten durchgeführt, nur diesmal unter Zusatz von 0,1 mol/l NaCl. Die beiden erhaltenen Überstände werden vereinigt.

Der Leukozytenextrakt wird zur Vorbereitung auf die anschließende Affinitätschromatographie gegen 0,1 mol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 6,0), der 0,5 mol/l NaCl und 0,5 mmol/l MnCl<sub>2</sub> enthält, dialysiert.

#### **2.18.2.2.3 Affinitätschromatographie an Concanavalin-A-Sephrose**

Die Chromatographie wird an einer mit Concanavalin-A-Sephrose gefüllten Säule (1 cm x 30 cm) durchgeführt. Das Säulen-

material wird zunächst mit ca. 2 l Wasser gewaschen und dann mit 2 l 0,1 molarem  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,0, NaCl (0,5 mol/l),  $\text{MnCl}_2$  (0,5 mmol/l) äquilibriert. Der Leukozytenextrakt wird dann mit einer Fließgeschwindigkeit von 20 ml/h 16 h mit Hilfe einer Schlauchpumpe über die Säule zirkuliert. Zur Entfernung nichtgebundenen Proteins wird die Säule mit dem Äquilibrierungspuffer proteinfrei gewaschen. Zur Elution des an Con-A-Sephарose gebundenen Proteinanteils (PMNL-Elastase) wird die Säule mit 2 l Äquilibrierungspuffer, der zusätzlich noch 0,5 mol/l  $\alpha$ -Methyl-glucopyranosid enthält, proteinfrei gewaschen.

#### **2.18.2.2.4 Elastin-Sephарose-Affinitätschromatographie**

##### **a) Herstellung von löslichem Elastin**

5 g Elastin vom Rind werden in 40 ml 0,25 mol/l Oxalsäure 1 h bei 100 °C gekocht. Nach Abkühlen der Suspension wird 5 min bei 400 x g zentrifugiert (Labofuge 6000). Der Vorgang wird dreimal mit dem jeweils verbleibenden Pellet wiederholt. Die vereinigten Überstände (ca. 150 ml) werden sechsmal gegen je 4 l bidest. Wasser dialysiert. Das lösliche Elastin wird lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

##### **b) Kopplung von Elastin an CNBr-aktivierte Sepharose 4B**

Die Sepharose wird mit dem 20fachen Volumen (w/v) 0,1 mol/l Natriumboratlösung pH 9,9 gewaschen. Es wird das gleiche Volumen löslichen Elastins (20 mg Elastin/1 ml Sepharose) im selben Puffer zugegeben und 3 h bei 4 °C gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch 72 h bei 4 °C gelagert und anschliessend sorgfältig mit 0,05 mol/l Natriumphosphat-Puffer pH 7,6 gewaschen. Die so hergestellte Elastin-Sephарose wird im gleichen Puffer unter Zugabe von 0,2 % Natriumazid bei 4 °C gelagert.

#### **Affinitätschromatographie an Elastin-Sephарose**

Die Elastin-Sephарose-Säule (10 x 100 mm) wird mit 0,025 mol/l Natriumpyrophosphat-Puffer (pH 5,9), der 0,035 mol/l an  $\beta$ -Alanin und 10 %ig an Saccharose ist, äquilibriert. Die aus 2.18.2.2.3 vorgereinigte Elastase-Fraktion wird gegen Wasser dialysiert und nach Lyophilisation im

Äquilibrierungspuffer gelöst. Die Lösung läßt man über Nacht über die Säule zirkulieren. Die Säule wird so lange mit obigen Puffer gewaschen, bis das Eluat proteinfrei ist (ca. 100 ml Puffer). Anschließend wird mit 0,025 mol/l Natriumpyrophosphat-Puffer pH 6,4, der 0,035 mol/l  $\beta$ -Alanin, 10 % Saccharose und 6 mol/l Harnstoff enthält, eluiert (30 ml/h, 2 ml Fraktionen). Die Fraktionen werden mit Methoxysuccinyl-L-Ala-L-Pro-l-Val-p-nitroanilid (MSAAPVNA, Fa. Serva) als Substrat auf Elastase-Aktivität getestet. Die Elastase-Aktivität enthaltenden Fraktionen werden mittels SDS-PAGE (s.2.18.2.2.5) auf Reinheit geprüft und charakterisiert.

#### **2.18.2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Charakterisierung der isolierten PMNL-Elastase**

##### **a) Zusammensetzung des Trenngels**

###### **Lösung A:**

24,3 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  
8,2 g Natriumacetat  
3,7 g Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)  
werden mit Essigsäure auf pH = 7,4 eingestellt und mit bidest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

###### **Lösung B:**

40 g Acrylamid  
1,5 g N,N'-Methylenbisacrylamid  
werden mit bidest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

###### **Lösung C:**

2 g Natriumdodecylsulfat  
werden mit bidest. Wasser auf 10 ml aufgefüllt.

###### **Lösung D:**

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

###### **Lösung E:**

1,5 g Ammoniumperoxodisulfat  
werden mit bidest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Die Trenngelmischung wird wie folgt hergestellt:

6 ml Lösung A  
15 ml Lösung B

3 ml Lösung C  
0,2 ml Lösung D  
3 ml Lösung E werden mit bidest. Wasser auf 60 ml  
aufgefüllt.

Die Lösung polymerisiert in einer Kassette (LKB 2117-204 Polymerisationskassette), pro Platte können 20 Proben à 10 µl aufgetragen werden. Die Proteinkonzentration der Proben beträgt ca. 10 µg/µl.

#### b. Elektrodenpuffer

200 ml Lösung A (s.o.)  
1800 ml bidestilliertes Wasser  
4 g Natriumdodecylsulfat  
Pro Pufferkammer (LKB-Multiphor-System) werden 1000 ml des Elektrodenpuffers eingesetzt.

#### c. Probenpuffer

6 ml Lösung A  
3 ml Lösung C werden mit bidest. Wasser auf 20 ml aufgefüllt.

#### d. Färbereagenz

2,5 g Comassieblau G250  
90 ml Essigsäure  
500 ml Methanol  
410 ml bidestilliertes Wasser

#### e. Fixierbad

250 g Trichloressigsäure werden mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

#### f. Entfärber

700 ml destilliertes Wasser  
200 ml Methanol  
100 ml Essigsäure

#### g. Durchführung der elektrophoretischen Trennung:

Das Probenmaterial wird 5 min bei 90-95 °C (Wasserbad) mit Probenpuffer behandelt (verschlossene Eppendorf-Reaktionsgefäße). Die elektrophoretische Trennung erfolgt nach Zentrifugation (Microfuge 12, Beckman) aus dem Überstand. Zur reduktiven Proteinspaltungen wird dem Probenpuffer 5 %ig β-

Mercaptoethanol zugesetzt. Die Trennung wird bei einer Feldstärke von 5-6 V/cm durchgeführt.

Trenndauer: 4 Stunden (max. 5 Stunden)

Als Frontmarker wird einer Probe Bromphenolblau zugesetzt.

Nach der Trennung wird die Platte 16 h fixiert, 2 h gefärbt und anschliessend mittels zweimal 0,5 l Entfärberlösung entfärbt. Die Laufstrecken der angefärbten Proteinbanden werden mit dem Lineal bestimmt.

h. Molmassenmarker-Kit (Fa. Pharmacia):

Markerprotein	M(X)
Phosphorylase b	94.000
Albumin	67.000
Ovalbumin	43.000
Anhydrase	30.000
Trypsin-Inhibitor	20.100
Lactalbumin	14.400

**Auswertung:**

Die Laufstrecken der Markerproteine werden mit den Logarithmen der angegebenen Molmassen mittels linearer Regressionsanalyse ausgewertet. Anhand der elektrophoretischen Laufstrecke der gereinigten PMNL-Elastase wird aus der erhaltenen Eichgeraden die molare Masse bestimmt.

**2.18.2.2.6 Elastase-Aktivitätstest**

**a) Lederblau-Test zur Aktivitätsbestimmung von Schweinepankreas-Elastase**

Enzympuffer (1 l):      0,05 mol Tris/HCl  
                             0,15 mol NaCl  
                             0,005 mol CaCl<sub>2</sub>  
                             0,02 % BSA                                pH = 7,5

Substratpuffer (1 l): 0,05 mol Tris/HCl  
 0,15 mol NaCl  
 0,003 % Triton X 100                      pH = 7,5

Enzym: 0,72 µg/30 µl = 20 µl Elastase (Typ I, Sigma Nr. E1250) in 2 ml  
 2,1 mol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, davon 1,2 ml auf 10 ml Enzympuffer auffüllen

Substrat: Hide-Powder-Azure, Sigma Nr. H4631  
 50 mg/ml Substratpuffer

Durchführung: 20 µl der Inhibitorsubstanz werden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit Substanzlösung auf 200 µl aufgefüllt. Dazu werden unter starkem Rühren 30 µl Elastaselösung und anschließend 150 µl Substratlösung zupipettiert. Nach kurzem Schütteln werden die Proben 6 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wird die Reaktion mit 1 ml eiskaltem Wasser abgestoppt, und die Reaktionsgefäße werden nach Schütteln 10 min zentrifugiert (Mikrofuge 12, Beckman). Die Messung erfolgt in Mikroküvetten bei 595 nm gegen den Substratpuffer als Leerwert.

*b) Bestimmung der Elastase-Aktivität mit einem p-Nitroanilid-gekoppelten Peptids als Substrat*

Zur Bestimmung von Elastase-Aktivitäten während der Reinigungsschritte und zur Charakterisierung des gereinigten Enzyms wird folgendes kommerziell erhältliches Peptid (Calbiochem GmbH, Nr. 454454) als Substrat eingesetzt: Methoxysuccinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Val-p-Nitroanilid (MSAAPVNA). Das chromogene Substrat erlaubt eine einfache Aktivitätsbestimmung durch photometrische Substratumsatzbestimmung bei 410 nm; der molare Absorptionskoeffizient beträgt bei dieser Meßwellenlänge  $\epsilon = 12.800 \text{ l}/(\text{mol} \times \text{cm})$ :

Substratpuffer: 0,1 mol/l 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure (HEPES) und 0,5 mol/l Natriumchlorid (NaCl) in bidest. Wasser lösen, mit 10 %iger Salzsäure auf pH=7,4 einstellen.

#### Durchführung der Bestimmungen:

Das Substrat (MSAAPVNA) wird 1 mmol/l in Dimethylsulfoxid (DMSO) vorgelöst und 1 + 9 mit Substratpuffer verdünnt.

1 ml dieser Substratlösung werden mit 50 µl Enzymlösung (Säulenfraktionen bzw. Enzymstammlösungen) 2 h bei 37 °C (Wasserbad) inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit 1 ml eiskaltem Ethanol wird die Extinktion bei 410 nm bestimmt.

#### *2.18.2.2.7 Bestimmung der Michaeliskonstanten $K_m$ von gereinigter PMNL- bzw. Schweinepankreas-Elastase*

Mit dem unter 2.18.2.2.6b beschriebenen Assay wurde mit gereinigtem Enzym die Aktivität in Gegenwart folgender Substratkonzentrationen bestimmt:

Substratlösung in DMSO: 0,025/ 0,05/ 0,10/ 0,20/ 0,30/ 0,50 mmol/l.

Der weitere Bestimmungsablauf erfolgte, wie unter 2.18.2.2.6b beschrieben, mit Enzymstammlösungen mit  $c = 50 \mu\text{g/ml}$  an gereinigter PMNL-Elastase bzw. Schweinepankreas-Elastase.

#### *2.18.3 Ergebnisse und Diskussion*

Das beschriebene Testverfahren zur Elastase-Aktivitätsbestimmung mittels Lederblau als Substrat wurde schon seit langer Zeit für das Screening potentieller Inhibitoren dieses Enzyms eingesetzt. Da die Prüfungen aber routinemäßig mit Schweinepankreas-Elastase durchgeführt wurden, stellte sich die Frage, ob in diesem Testsystem gefundene Inhibitoren zwangsläufig auch Hemmer der Elastase aus polymorphkernigen Leukozyten sind, die ja für die Bindegewebs- und Knorpeldestruktion bei rheumatoiden Arthritiden mitverantwortlich ist. Aus diesem Grund war es notwendig, Elastase aus poly-



morphkernigen Leukozyten zu gewinnen, zu reinigen und einige im Routinescreening als inhibitorisch wirksam befundene Verbindungen auf ihren Einfluß auf das Leukozyten-Enzym hin zu untersuchen. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

Mittels der beschriebenen Reinigungsmethode konnte eine elektrophoretisch reine PMNL-Elastase hergestellt werden, wobei das Enzym - eine strenge Elastasespezifität des Substrats bei der Aktivitätsbestimmung aus dem Leukozytenextrakt vorausgesetzt (!) - nur ca. 7fach aufgereinigt wurde:

1000 mg Leukozytenextraktprotein mit 0,40 U/mg Protein ergaben 1 mg reine PMNL-Elastase mit 2,90 U/mg, wobei nur ca. 0,7 % der eingesetzten Enzymaktivität wiedergewonnen werden konnten.

Als sehr effektiv erwies sich die Affinitätschromatographie an Concanavalin A. Die Chromatographie konnte vereinfacht auch im Batch-Verfahren erfolgreich durchgeführt werden.

Der größte Enzymverlust (ca. 60 % der eingesetzten Enzymaktivität) wurde bei der Elastinsepharose-Affinitätschromatographie festgestellt, wobei eine vollständige Elution des gebundenen Enzyms nicht möglich zu sein scheint.

Die so gewonnene PMNL-Elastase war jedoch sehr rein, was auch durch Bestimmung der Michaeliskonstante von  $K_m = 0,24 \text{ mmol/l}$  (Abb. 2.49) - ein Wert, der sehr gut mit dem von Nakajima et al. (1979), ermittelten übereinstimmt - bestätigt werden konnte. Auch die elektrophoretisch bestimmte Molmasse von 18.000 g/mol stimmt gut mit literaturbekannten Daten (Taylor et al., 1975) überein.

Die Spezifität des Peptidsubstrates für PMNL-Elastase konnte bestätigt werden. So ließ sich für Schweinepankreaselastase eine Michaeliskonstante von  $K_m = 4,85 \text{ mmol/l}$  ermitteln (Abb. 2.50), was die geringere Affinität des Schweineenzym zum Substrat verdeutlicht.

Aus firmenpolitischen Gründen wurde das Screening auf dem Gebiet der Elastaseinhibition eingestellt. Weitergehende Untersuchungen mit verschiedenen Enzymquellen und/oder Test-

systemen, wie dies bei der Inhibition der PMNL-Kollagenase (2.17 des Berichts) erfolgte, konnten daher für diesen methodischen Approach nicht durchgeführt werden.

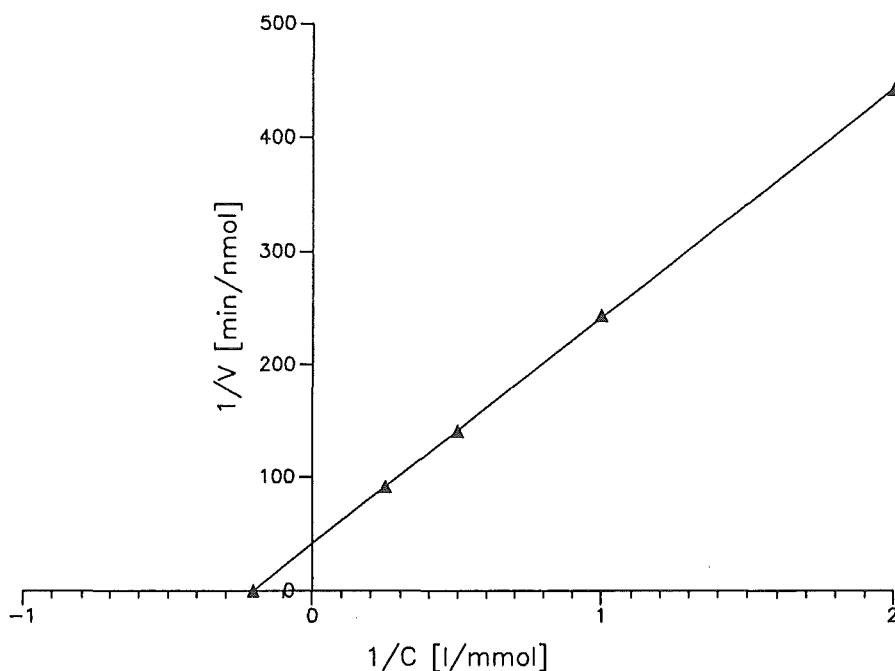


Abb. 2.49: Graphische Auftragung der Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von der Substratkonzentration nach Lineweaver-Burk.

Die Inkubationsansätze enthielten 4,2 µg gereinigte PMNL-Elastase in 0,1 mol/l HEPES-Puffer/ 0,5 mol/l NaCl/ 10 % DMSO in einem Gesamtvolumen von 2,05 ml. Die Konzentrationen des synthetischen Substrates MSAAPVNA lagen im Bereich von 0,025 - 0,5 mmol/l. Nach einer Inkubationszeit von 4,5 h (A) wurde die Reaktion durch Zusatz von 1 ml eiskaltem Ethanol gestoppt und die Absorption bei 410 nm im Spektralphotometer bestimmt ( $\epsilon = 12.800 \text{ l}/(\text{mol} \times \text{cm})$ ).

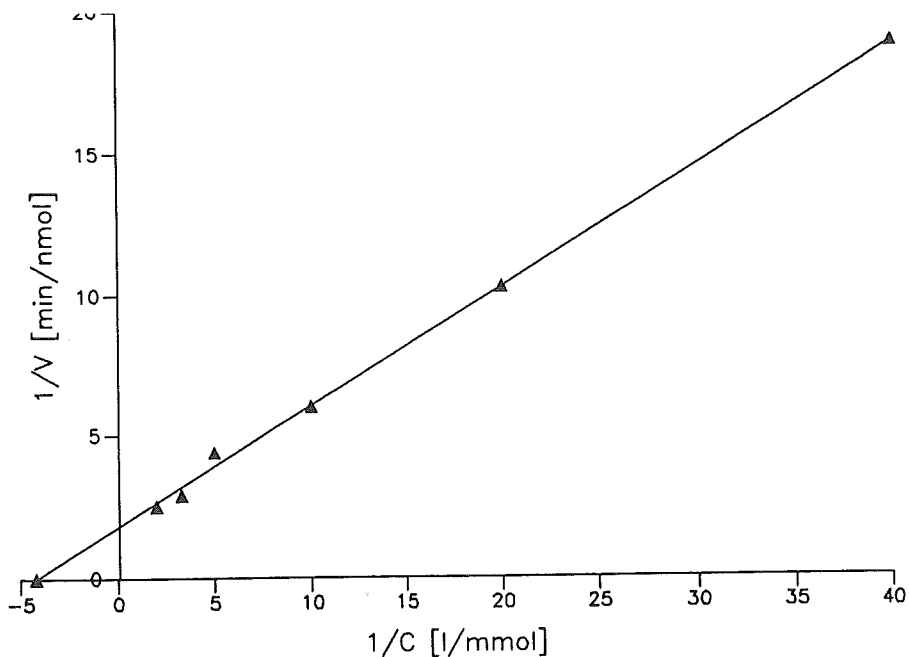


Abb. 2.50: Graphische Auftragung der Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von der Substratkonzentration nach Lineweaver-Burk.

Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zur Abb. 2.49 beschrieben, durchgeführt, mit der Ausnahme, daß Schweinepankreas-Elastase (spez. Akt. 33,9 Einheiten/mg Protein) eingesetzt wurde.

## **2.19 Hyaluronsäurebiosynthese in vitro**

### **2.19.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

In Gegenwart von  $^3\text{H}$ -Glucosamin und  $^{35}\text{S}$ -Sulfat bilden Chondrozyten, Fibroblasten, Hepatozyten und andere Zellen radioaktiv markierte Hyaluronsäure und radioaktiv markierte Proteoglykane, die nach proteolytischem Abbau und säulenchromatographischer Trennung der Reaktionsprodukte quantifiziert werden können. In Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das sich in diesem Testsystem entweder mit Hilfe von Glucose/Glucoseoxidase oder Hypoxanthin/Xanthinoxidase generieren läßt, werden die radioaktiv markierten Precursor-Moleküle vermindert in die Makromoleküle eingebaut, wobei besonders die Hyaluronsäure-Biosynthese betroffen ist. In Gegenwart von Prüfsubstanzen kann der Effekt der Peroxide auf die Hyaluronsäure-Biosynthese vermindert sein. Solche Substanzen könnten eine protektive Wirkung beim Abbau von Gelenkknorpel im Rahmen rheumatischer Gelenkentzündungen haben.

### **2.19.2 Material und Methoden**

#### **HPLC-Methode zur Trennung und Quantifizierung von Hyaluronsäure und Chondroitinsulfaten**

Degradationspuffer:

0,25 mol/l Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)  
0,05 % Rinderserum Albumin (BSA) in bidest. Wasser, mit Salzsäure ( $c = 1 \text{ mol/l}$ ) auf  $\text{pH} = 8,0$  einstellen.

Im Eppendorf-Reaktionsgefäß werden jeweils 1 mg Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat A, B bzw. C (zur Herstellung von Referenzdisaccharidlösungen) bzw. lyophilisiertes Probenmaterial (z.B. Zellen) in 40  $\mu\text{l}$  Wasser und 15  $\mu\text{l}$  Degradationspuffer gelöst und mit 20  $\mu\text{l}$  Chondroitinase ABC-Lösung (0,5 U/ml) 18 h bei 37 °C inkubiert (Wasserbad).

Nach Zusatz von 300  $\mu\text{l}$  kaltem (-20 °C) absolutem Ethanol wird zur Fällung nicht-degradierter Glycosaminoglykane (GAG) (bei Probenmaterial wie z.B. Zellmaterial wichtig!) 4 h bei -20 °C inkubiert und das Präzipitat durch Zentrifugation (Microfuge 12, 5 Minuten bei 10.000 x g, 4 °C) abgetrennt. Für einen

HPLC-Lauf werden 1-10 µl dieser Referenzdisaccharidlösung benötigt, bei anderem Probenmaterial (Zellen/Medium etc.) werden bis zu 100 µl appliziert.

#### ***HPLC-Trennung der Disaccharide:***

Es wird eine Reverse-Phase Säule (Partisil-5PAC, 5 µm RP8-Material, 250 x 4,6 mm) mit Vorsäule (Co-Pell PAC, 40 x 4,6 mm) in einem Hewlett Packard - HPLC (Modell 1084B) eingesetzt.

Als mobile Phase wird folgende Mischung verwendet:

52 % Acetonitril

12 % Methanol

36 % wässriger Tris-Puffer, pH = 8,0, c = 0,5 mol/l

Die optimale Flußrate beträgt 2,4 ml/Minute .

#### ***2.19.3 Ergebnisse und Diskussion***

Um die zeitraubenden und schlecht reproduzierbaren Trennverfahren (Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie), die in der Literatur beschrieben sind, zu vermeiden, sollte ein HPLC-Trennsystem etabliert werden, welches nach enzymatischer Degradation der Glykosaminoglykane mittels Chondroitinase ABC die Trennung und die Quantifizierung der erhaltenen Disaccharide erlaubt. Abb. 2.51a zeigt ein HPLC-Chromatogramm, aus dem ersichtlich ist, daß unter den gewählten Bedingungen Hyaluronsäure-Disaccharide nicht von nicht-sulfatierten Chondroitinsulfat-Disacchariden getrennt werden konnten. Auch der Zusatz von Borsäure zur mobilen Phase nach der Methode von Zebrower et al. (1986) konnte dieses Trennproblem nicht zufriedenstellend lösen (Abb. 2.52b).

Weitere Untersuchungen sollten zeigen, wie groß der Anteil unsulfatierter Chondroitin-Disaccharide nach Abbau mit Chondroitinase ABC ist, so daß möglicherweise auf die Trennung dieser Disaccharide im Rahmen des Screenings verzichtet werden kann. Um die untere Nachweisgrenze und die Reproduzierbarkeit des entwickelten analytischen Verfahrens festzustellen, wurden Eichkurven für die Disaccharide aus Hyaluronsäure, Chondroitin-4-sulfat und Chondroitin-6-sulfat erstellt. Für die drei Glykosaminoglykane ergab sich eine

untere Nachweisgrenze von 0,5-1 µg bei Korrelationen, die besser als  $r = 0,99$  waren.

Mit der vorgestellten Methode wurde anschliessend versucht, den Hyaluronsäure- bzw. Chondroitinsulfat-Stoffwechsel in Zellsystemen zu untersuchen.

Eingesetzt wurden humane Hautfibroblasten bzw. Osteosarcomazellen (Detroit 551 bzw. CRL1545 - beide von der "American Type Culture Collection (ATCC)") - und eine bei uns etablierte Zelllinie von Kaninchen-Aortenzellen. Untersucht wurden die extrazellulären, d.h. ins Kulturmedium sezernierten, und die zellulären Glycosaminoglykane (GAG), wobei letztere noch durch Trypsinbehandlung der Zellen in membranassoziierte und intrazelluläre GAG differenziert wurden (Methode nach Kleesiek et al., 1987). Es zeigte sich, daß die Sensitivität der angewandten nicht-radioaktiven Bestimmungsmethode zu gering ist, um den GAG-Metabolismus in Zellkultursystemen verfolgen zu können. Die Anwendung von radioaktiven Vorläufermolekülen der GAG, wie z.B. von  $^{14}\text{C}$ -Glucosamin oder von  $^{35}\text{S}$  markiertem Natriumsulfat, würde die Empfindlichkeit der Methode jedoch erheblich steigern und damit Untersuchungen auch in Zellsystemen erlauben (Kleesiek, et al., 1987). Für einen screeningmäßigen Einsatz wäre bei dieser Methodik jedoch ein HPLC-Radioaktivitätsmonitor notwendig, der uns im Projektzeitraum für unsere Untersuchungen leider nicht zur Verfügung stand. Weitergehende Untersuchungen wurden daher nicht durchgeführt.

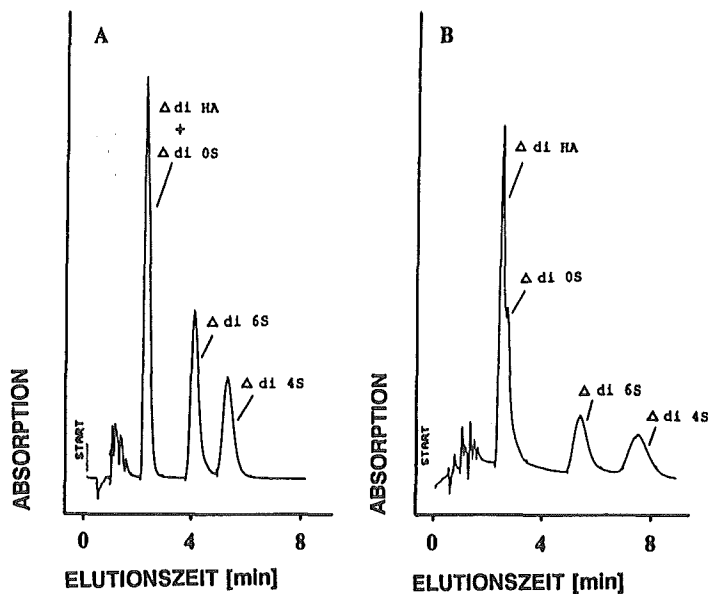


Abb. 2.51: Trennung der Disaccharide nach Degradation von Glycosaminoglykanen (GAG's) mit Chondroitinase ABC. Die kommerziell erhältlichen Standardsubstanzen Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat A bzw. C (Sigma) wurden bei 37 °C 16 h mit 0,5 Einheiten Chondroitinase ABC/mg GAG in 50 mmol/l Tris/ 0,05 % BSA (pH 8,0) inkubiert. Durch Zusatz eines 4fachen Inkubationsvolumens von -20 °C-kaltem Ethanol und einer 4stündigen Inkubation bei -20 °C wurden die nicht degradierten GAG's präzipitiert. Nach Zentrifugation in einer Beckman-Microfuge wurden 10 µl des Überstandes für eine HPLC-Analyse eingesetzt.

#### HPLC-Analyse:

Eine "Partisil-5PAC"-Säule (5 µm, 25 cm x 4,6 mm φ), geschützt durch eine Vorsäule "Co-Pell PAC", wurde zur Trennung der Disaccharide eingesetzt.

Mobile Phase (v/v): 52 % Acetonitril, 12 % Methanol, 36 % eines 0,5 mol/l Tris-Puffers mit (B) bzw. ohne (A) 0,1 mol/l Borsäure (pH 8,0). Die Durchflußrate betrug 2,4 ml/min.

#### Abkürzungen:

- di OS: 2-Acetamido-2-desoxy-3-O-(β-D-glucopyranosyluronic acid)-D-galactose
- di HA: 2-Acetamido-2-desoxy-3-O-(β-D-glucopyranosyluronic acid)-D-glucose
- di 4S: 2-Acetamido-2-desoxy-3-O-(β-D-glucopyranosyluronic acid)-4-O-sulfo-D-galactose
- di 6S: 2-Acetamido-2-desoxy-3-O-(β-D-glucopyranosyluronic acid)-6-O-sulfo-D-galactose

## **2.20 Inhibition der C3-Konvertase**

### **2.20.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Die Messung der C3-Konvertase-Aktivität erfolgt durch die antikörperabhängige Immnhämolyse von Schafererythrozyten. Nach Beladung von Erythrozyten (E) mit Antikörpern (A) werden die Komplementproteine C1, C4, C2 an die Erythrozyten angelagert. Dadurch entsteht auf der Oberfläche der Erythrozyten die C3-Konvertase (EAC 1,4,2). Nach Zugabe von gereinigtem C3 wird dieses durch die C3-Konvertase unter Bildung von EAC 1,4,2,3b gespalten. In Gegenwart der Faktoren C5-C9 kommt es zur Lyse der mit C3b beladenen Erythrozyten, die photometrisch quantifiziert werden kann. Inhibitoren der C3-Konvertase-Aktivität können anhand verminderter Erythrozyten-Hämolyse identifiziert werden. Da dem Komplementsystem bei verschiedenen Autoimmun-, chronisch-entzündlichen Erkrankungen und besonders beim akuten Atemnotsyndrom des Erwachsenen (ARDS) und der Schocklunge eine wesentliche Bedeutung zukommt, könnten Hemmer der C3-Konvertase wirksame Pharmaka für die Therapie dieser Erkrankungen sein.

### **2.20.2 Material und Methoden**

#### **2.20.2.1 Versuchstiere**

Meerschweinchen, männlich, 200-300 g schwer, Süddeutsche Versuchstierfarm werden in Makrolonkäfigen bei Standardfutter (Altromin, Lage) und Wasser ad libitum gehalten.

Raumtemperatur:	20 ± 2 °C
Hell-Dunkel-Rhythmus:	12 h
Luftwechsel:	16fach/h

Als Erythrozytenspender dient ein männliches Schaf (Weidenhaltung).



### 2.20.2.2 Puffer

a) VBS-Puffer, pH 7,3:

NaCl (Merck)	83,00 g
Na-5,5-diethylbarbiturat	<u>10,19 g</u>
ad 1500 ml Aqua dest.	

mit 1 mol/l HCl auf pH 7,3 einstellen und mit Aqua dest.  
auf 2000 ml auffüllen.

b) VBS-EDTA:

74,6 g EDTA (Titriplex, Merck)  
in 100 ml 2 mol/l NaOH aufnehmen und mit Aqua dest. auf  
1000 ml auffüllen (0,2 mol/l). Mit 2 mol/l NaOH auf  
pH 7,65 einstellen.

Für Gebrauch:

320 ml VBS-Puffer
<u>200 ml 0,2 mol/l EDTA</u>
ad 2000 ml Aqua dest. (pH 7,5)

c) VBS-EDTA-Gelatine:

320 ml VBS-Puffer
200 ml 0,2 mol/l EDTA
<u>0,6 g Gelatine</u>
ad 2000 ml Aqua dest. (pH 7,5)

d) VBS-Gelatine<sup>++</sup>:

400 ml VBS-Puffer
1 ml 0,3 mol/l CaCl <sub>2</sub> (3,3 g/l)
<u>1 ml 2,0 mol/l MgCl<sub>2</sub> (410 g/l)</u>
ad 2000 ml Aqua dest. (pH 7,3)

e) Alseverscher Lösung:

Glucose (Merck)	2,05 g
Na-citrat x H <sub>2</sub> O (Merck)	0,80 g
Citronensäure (Merck)	0,055 g
<u>NaCl (Merck)</u>	<u>0,42 g</u>
ad 100 ml Aqua dest. (pH 6,1)	

### 2.20.2.3 Reagenzien

- a) Ambozeptor-Lösung (Kaninchen-anti-Schaferythrozyten-Serum)  
Behring, Marburg; Ambozeptor 6000 (enthält 6000 Einheiten)

- b) Cobra venom factor (CVF)  
Cordes Lab., Miami, aus *Naja naja kaouthia*
- c) Hydrazinium-hydroxid (Merck)  
eine 0,16 mol/l Lösung wird in H<sub>2</sub>O hergestellt
- d) Meerschweinchenserum ohne C3 und C5 (R3)  
40 ml frisches Serum werden mit 200 mg CVF 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das R3 wird in 200 µl Portionen bei -70 °C eingefroren.
- e) Meerschweinchenserum ohne C3 und C4 (R4)  
20 ml frisches Serum werden mit 5 ml 0,16 mol/l Hydrazin-Lösung gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Einstellen auf pH 7,2 mit 0,15 mol/l HCl wird in 100 µl-Portionen bei -70 °C eingefroren.
- f) C3 Komponente  
Meerschweinchen-Komplement-Komponente C3 wird isoliert und gereinigt nach Bitter-Suermann et al. (1970) und in einer Konzentration von 14 mg Eiweiß/ml aliquotiert bei -70 °C gelagert.

#### **2.20.2.4 Herstellung der Antikörper-beladenen Schaf-Erythrozyten (EA-Zellen)**

Einem männlichen Schaf werden aus der Vena carotis 25 ml Blut in 50 ml sterile Alserverseher Lösung abgenommen und mindestens 7, maximal 21 Tage bei 4 °C gelagert. 30 ml Blut-Alserver-Suspension werden mit 150 ml VBS-Puffer gemischt und 5 min bei 2.500 U/min (ohne Bremse) und 4 °C zentrifugiert. Mit einer spitzen 2 ml-Pipette wird die Leukozytenschicht abgenommen und anschließend der Überstand abgesaugt. Die Erythrozyten werden in 150 ml VBS-EDTA aufgenommen und 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird wieder abzentrifugiert (5 min, 2.500 U/min, 4 °C), und die Zellen werden erneut in 150 ml VBS-EDTA aufgenommen. Dieser Schritt wird noch 2mal wiederholt und die Erythrozyten auf eine Konzentration von  $1 \times 10^9$  Zellen/ml VBS-EDTA eingestellt. Dazu wird eine Verdünnung von 1 : 200 in Aqua dest. hergestellt und bei 405 nm gegen eine Haemoglobin-Eichkurve spektrophotometrisch gemessen. Die gewünschte Verdünnung wird wie folgt ausgerechnet:

$$\frac{\text{Eichkurvenwert} \times 10^6 \times 200 \times 150}{1 \times 10^9} = V$$

V - 150 = x ml VBS-EDTA,  
die noch zugegeben werden müssen.

Zu 50 ml dieser Zell-Suspension ( $1 \times 10^9$  Zellen/ml VBS-EDTA) werden 50 ml einer Ambozeptorlösung (1 : 600 mit Aqua dest. verdünnt) gegeben und 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach abzentrifugieren (5 min, 2.500 U/min, 4 °C) werden die Zellen jetzt 2mal mit 100 ml VBS-EDTA-Gelatine-Puffer gewaschen und anschließend in 50 ml VBS-Gelatine<sup>++</sup> aufgenommen. Um eine Konzentration von  $5 \times 10^8$  EA-Zellen/ml zu erreichen, wird eine Verdünnung von 1 : 100 in Aqua dest. hergestellt und bei 405 nm gegen eine Haemoglobin-Eichkurve gemessen. Das aufzufüllende Volumen an VBS-Gelatine<sup>++</sup>-Puffer wird wie folgt errechnet:

$$\frac{\text{Eichkurvenwert} \times 10^6 \times 100 \times 50}{5 \times 10^8} = V$$

V - 50 = x ml VBS-EDTA,  
die noch zugegeben werden müssen.

#### 2.20.2.5 Herstellung der C3-Konvertase (EAC 1,4,2)

Eine 1:60-Verdünnung von R3 in VBS-Gelatine<sup>++</sup> wird 1:1 (v/v) mit  $5 \times 10^8$  EA-Zellen 10 min bei 37 °C inkubiert, anschließend abzentrifugiert (5 min, 2.500 U/min, 4 °C) und mit VBS-Gelatine<sup>++</sup> gewaschen. Mit Hilfe einer 1 : 100 Verdünnung in Aqua dest. und Ablesen gegen eine Haemoglobin-Eichkurve bei 405 nm (siehe 2.20.2.4) wird die EAC 1,4,2 auf eine Konzentration von  $1,3 \times 10^8$ /ml VBS-Gelatine<sup>++</sup> eingestellt.

#### 2.20.2.6 Durchführung der Untersuchung (nach Bitter-Suermann et al., 1970)

Testsubstanzen werden in Aqua dest. in der gewünschten Konzentration gelöst und nach dem folgenden Pipettierschema inkubiert:

H <sub>2</sub> O	VBS-Gelatine <sup>++</sup>	gereinigtes C3a	Test-Substanz	EAC 1,4,2
[μl]	[μl]	[μl]	[μl]	[μl]
1200	-	-	-	100
-	1200	-	-	100
-	1100	-	100	100
-	1000	100	100	100

Es wird geschüttelt und 1 h bei 37 °C inkubiert.

Nach Abzentrifugieren (10 min, 2.500 U/min) wird der Überstand abgesaugt und das Sediment in 1000 μl R4 (1 : 1000 verdünnt) und 300 μl VBS-Gelatine<sup>++</sup> resuspendiert. Diese Mischung wird 90 min bei 37 °C in einem Schüttelbad inkubiert und danach 20 sec abzentrifugiert. Die Proben werden bei 405 nm gegen VBS-Gelatine<sup>++</sup> spektrophotometrisch gemessen und die Hämolyse als "site-forming-units" (SFU) ausgedrückt (Rapp und Borsos, 1970).

#### 2.20.2.7 Bestimmung der Elastase- und Kollagenase-Aktivität

Um die Spezifität der Inhibition der C3-Konvertase durch Prüfsubstanzen zu überprüfen, werden diese in verschiedenen Konzentrationen für 18 h bei 37 °C mit 0,0024 U/ml Elastase (aus Schweinepankreas, Sigma) oder 0,61 U/ml Kollagenase (aus Clostridium histolyticum, Typ VII, Sigma) inkubiert und die Reaktion spektrophotometrisch nach Rinderknecht et al., 1968, verfolgt (siehe Kap. 2.17 bzw. 2.18).

### 2.20.3 Ergebnisse und Diskussion

Diese Modell ist ursprünglich von Dr. Englberger an der Universität Mainz erarbeitet worden und wurde von dort übernommen.

Von den in Mainz geprüften Substanzen waren Rosmarinsäure, ein aus *Melissa officinalis* extrahierter Naturstoff, sowie chemisch synthetisierte Rosmarinsäure-Derivate die potentesten Inhibitoren der C3-Konvertase. Die Abhängigkeit der C3-Konvertase-Inhibition von der Rosmarinsäure-Konzentration ist in Abbildung 2.52 dargestellt.

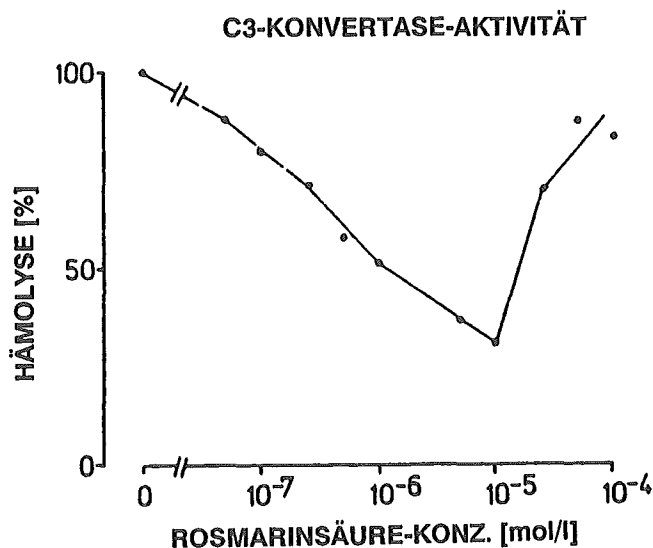


Abb. 2.52: Hemmung der C3-Konvertase durch Rosmarinsäure.

Erythrozyten wurden mit Antikörpern und den Komponenten C1, C4 und C2 beladen und mit C3 sowie verschiedenen Konzentrationen von Rosmarinsäure ( $10^{-7}$  -  $10^{-4}$  mol/l) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Bildung von "site-forming units" (SFU) durch die Aktivität der C3-Konvertase wurde aus der Hämolysen ermittelt, die durch die Komponenten C5-C9 hervorgerufen wird. Die Inkubation in Gegenwart von C3 und Abwesenheit von Rosmarinsäure wurde als 100 %ige Hämolysen definiert.

Die Wirkung chemisch synthetisierter Rosmarinsäure-Derivate (in % Hemmung) ist in Tabelle 2.37 gezeigt.

Struktur-Wirkungs-Untersuchungen ermöglichten dabei eine weitgehende Identifizierung der für die Hemmung der C3-Konvertase essentiellen Strukturbestandteile der Substanzen.

Da die C3-Konvertase eine Serin-Protease ist, war es notwendig, die Spezifität der durch Rosmarinsäure bzw. -Derivate hervorgerufenen Hemmwirkung durch Untersuchung ihrer Wirkung auf andere Proteasen festzustellen. Dazu standen als Serin-Protease die Elastase und als Metallo-Protease die Kollagenase zur Verfügung. Vergleicht man die durch Rosmarinsäure und deren Derivate hervorgerufene Hemmung der C3-Konvertase und Elastase miteinander, so findet man eine gewisse Korrelation (Tab. 2.38); allerdings benötigt man für äquipotente Hemmung der Elastase eine bis zu 500fach höhere Inhibitorkonzentration. Die Kollagenase wird hingegen nur durch einige der geprüften Substanzen inhibiert. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß Rosmarinsäure und -Derivate eine gewisse Spezifität gegenüber der C3-Konvertase besitzen.

Tab. 2.37: Einfluß von Rosmarinsäure und einigen synthetisch hergestellten Derivaten auf die Bildung von "site-forming-units" (SFU) durch Einwirkung der C3-Konvertase-Aktivität.  
Mit Antikörpern und Komplementfaktoren C1, C4 und C2 beladene Erythrozyten wurden in Gegenwart von C3 und den jeweils genannten Verbindungen über 1 h inkubiert. Die Bildung der SFU wurde aus der durch die Komplementfaktoren C5-C9 bedingten Hämolyse berechnet.  
Bei der Berechnung wurde das Ergebnis, das in Abwesenheit der Hemmsubstanzen erzielt wurde, gleich 100 % SFU gesetzt.

Prüfsubstanz ( $10^{-5}$ mol/l)	Veränderung von SFU [%]
Rosmarinsäure	- 69
NAT 03-362	- 76
NAT 03-398	- 64
NAT 03-401	- 56
NAT 03-392	- 55
NAT 03-349	- 50
NAT 03-396	- 42
NAT 03-399	- 24
NAT 03-395	- 10
NAT 03-394	+ 12

**Tab. 2.38: Vergleichende Darstellung der Wirkung von Substanzen auf verschiedene proteolytische Enzyme.**  
*Die Effekte verschiedener Verbindungen ( $10^{-5}$  mol/l) auf die Bildung von "site-forming-units" (SFU) infolge Einwirkung der C3-Konvertase wurde mit dem Einfluß auf die proteolytische Aktivität von Elastase und Kollagenase bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-3}$  bzw.  $6,3 \times 10^{-3}$  mol/l verglichen. Die Hemmung der C3-Konvertase ist als Reduktion der Bildung von SFU in Prozent dargestellt. Die Elastase- bzw. Kollagenase-Aktivität wurde nach Rinderknecht et al. (1968) ermittelt und ist in % der Aktivität in Abwesenheit der Prüfsubstanzen angegeben..*

Substanz- Konz. [mol/l]	Veränderung der proteolytischen Aktivität [%]		
	C3-Konvertase	Elastase	Kollagenase
	$10^{-5}$	$5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-3}$
		( $6,3 \times 10^{-3}$ )	( $6,3 \times 10^{-3}$ )
Rosmarinsäure	- 69	(- 37)	(+ 6)
NAT 03-293	- 82	(- 70)	(+ 13)
NAT 03-362	- 76	(- 28)	(- 62)
NAT 03-401	- 56	- 87	- 60
NAT 03-392	- 55	- 27	- 4
NAT 03-349	- 50	- 62	- 70

In einem auch andere Substanzklassen umfassenden Screening auf Hemmer der C3-Konvertase wurden keine weiteren Inhibitoren mehr gefunden, so daß für eine In-vitro-/In-vivo-Korrelation nur die Rosmarinsäure bzw. verwandte Strukturen zur Verfügung standen. Tab. 2.39 zeigt einen Vergleich der Wirkung von Substanzen aus dieser Substanzklasse im Hämolyse-Plaque-Test (Methode nach Cunningham und Szenberg, 1968) und auf die C3-Konvertase-Aktivität.

Beim Hämolyse-Plaque-Test handelt es sich um ein Ex-vivo-Modell zur Erfassung einer spezifischen Antikörperantwort, also einer Reaktion von B-Lymphozyten. Vier Tage nach einer Immunisierung von Mäusen mit Schaferythrozyten wird ex vivo die Fähigkeit von B-Lymphozyten aus der Milz untersucht, Antikörper zu sezernieren, die unter den Testbedingungen nach Zugabe von Komplement-Faktoren Schaferythrozyten lysieren.



Tab. 2.39: Vergleichende Darstellung der Wirkung von Rosmarinsäure (RA) und ihrer strukturanalogen Verbindungen auf die Hämolyse-bedingte Plaquebildung ex vivo und die C3-Konvertase-Aktivität in vitro.

Die Verminderung der Anzahl Plaque-bildender Zellen (PFC) aus Mäusen, die mit Schafer erythrozyten immunisiert worden waren, ist in % angegeben und wurde mittels der Cunningham-Technik (Cunningham und Szenberg, 1968) bestimmt. Die Verbindungen wurden tägl. für 4 Tage nach Immunisierung in einer Dosis von 10 mg/kg i.v. bzw. in einer Dosis von 10 und 100 mg/kg p.o. appliziert. Die Werte entsprechen den mittleren Hemmungen der Bildung von PFC aus Milzzellen von mindestens 5 Mäusen. Die Effekte der Prüfsubstanzen ( $10^{-5}$  mol/l) auf die Bildung von "site-forming-units" (SFU) ist als % Reduktion angegeben.

Substanz	Dosis und Applikation [mg/kg]	Reduktion von PFC [%]	Reduktion von SFU [%]
Rosmarinsäure	10 i.v.	- 30	- 63
	10 p.o.	- 5	
NAT 03-383	10 i.v.	- 41	- 73
NAT 03-353	100 p.o.	25	25 <sup>a</sup>
NAT 03-359	100 p.o.	5	5 <sup>b</sup>
NAT 03-362	100 p.o.	36	76
NAT 03-392	100 p.o.	33	45

<sup>a</sup> 500 µmol/l

<sup>b</sup> 50 µmol/l

Das Ausmaß der Hämolyse erlaubt eine Aussage über die Aktivität der B-Lymphozyten und ihre Differenzierung zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen. Rosmarinsäure sowie einige chemisch synthetisierte Derivate zeigen eine gewisse Hemmwirkung im Hämolyse-Plaque-Test. Auffällig dabei ist, daß starke Hemmer der C3-Konvertase nur eine schwache bis mittlere Hemmung im Hämolyse-Plaque-Test zeigen. Auch durch eine Erhöhung der Dosis kann in der Regel keine größere Inhibitionsrate erzielt werden. Bei der Bewertung dieser Ergebnisse muß die relative Empfindlichkeit dieser Substanzklasse gegenüber Oxidation durch Luftsauerstoff sowie die sehr kurze Halbwertszeit von Rosmarinsäure im Blutplasma berücksichtigt werden. Auch die

Applikationsweise hat Auswirkungen auf den Effekt von Substanzen im Hämolyse-Plaque-Test, denn i.v. applizierte Rosmarinsäure ist wirksamer als oral applizierte. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, daß zumindest für Substanzen der genannten Strukturklasse die C3-Konvertase-Inhibition ein geeigneter In-vitro-Test für Substanzen ist, die in vivo einen Einfluß auf die Plaque-bildenden Zellen haben.

## 2.21 KB-Zellen-Test

### 2.21.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit

Mit Hilfe des Testmodells "KB-Zellen-Test" können Prüfsubstanzen auf zytostatische bzw. zytotoxische Wirkung überprüft werden. Als Maß für die zytotoxische Wirkung dient die Intensität eines stark blauen Farbstoffs, der mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen aus dem schwach gelben Tetrazoliumsalz MTT gebildet wird, wobei eine Korrelation zwischen Farbtintensität und Zellzahl bzw. ihrer metabolischen Aktivität besteht (Peters, J.H., Göttingen, persönliche Mitteilung). Als Maß für die zytostatische Wirkung wird die DNS-Syntheserate nach Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Thymidin in die Zellen bestimmt.

Substanzen mit zytotoxischer Wirkung weisen in der Regel eine deutlich verminderte metabolische Aktivität bei gleichzeitiger Reduktion der DNS-Syntheserate auf. Substanzen mit ausschließlich zytostatischer Wirkung sind durch eine deutliche Reduktion des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus mit nur geringer Beeinflussung der Bildung des blauen Farbstoffs als Maß für die Zellvitalität gekennzeichnet.

Zusätzlich kann der Einbau von  $^3\text{H}$ -Methionin in die Proteine von Hepatoma-Zellen als Maß für die Zytotoxizität von Prüfsubstanzen herangezogen werden.

Dieser Test dient einerseits der Ergänzung des In-vitro-Prüfsystems "Lymphozytenstimulation" und ermöglicht, Substanzen mit ausschließlich immunmodulatorischen Eigenschaften von generell zytostatisch und zytotoxisch wirkenden Substanzen abzugrenzen, und kann andererseits für ein generelles Screening von Prüfsubstanzen auf zytotoxische bzw. zytostatische Wirkung eingesetzt werden.

## **2.21.2 Material und Methoden**

### **2.21.2.1 Zellen**

#### **a) KB-Zellen**

Es wird eine humane Nasopharynx-Tumorzelllinie eingesetzt. Diese wird von Flow Laboratories, Meckenheim (Nr. 800198) bezogen. Die Zellen sind in Kulturmedium unter Zusatz von 10 % DMSO bei -196 °C mit der Passagenzahl 370 kryokonserviert.

#### **b) Hepatomazellen**

Es wurde eine humane Hepatomazelllinie, literaturbekannt unter der Bezeichnung HepG2, eingesetzt, welche uns 1985 vom Institut für klinische Chemie und Labormedizin der Universität Münster mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Schmitz, zur Verfügung gestellt wurde. Die Zellen sind in Kulturmedium unter Zusatz von 10 % DMSO bei -196 °C mit unbekannter Passagenzahl kryokonserviert.

### **2.21.2.2 Kulturmedium und Puffer**

#### **a) Kulturmedium**

Für das Kulturmedium werden folgende Medien, Medienadditiva und Antibiotika benötigt:

1. Minimum Essential Medium, nach Dulbecco (DMEM, Boehringer Mannheim Nr. 210048)
2. Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ , Merck Nr. 6323)
3. Streptomycinsulfat (Serva, Nr. 35500)
4. Penicillin G-Kaliumsalz (Serva, Nr. 31749)
5. Fötale Kälberserum (FKS, Seromed, verschiedene Chargen)
6. Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA, 100fach konzentriert, Boehringer Mannheim, Nr. 210293)
7. Rinderserumalbumin (BSA, Sigma A7906)

DMEM Pulverkonzentrat (für 5 l Medium)

- + 18,5 g  $\text{NaHCO}_3$
- + 0,5 g Streptomycinsulfat
- + 0,3 g Penicillin G (500.000 IU)

werden mit bidest. Wasser auf 5 l aufgefüllt und nach 15-30minütigem Rühren sterilfiltriert (Filter 0,2  $\mu\text{m}$ ,

Schleicher & Schüll, Nr. 401352).

Die NEAA werden vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Das FKS wird zur Inaktivierung von Proteasen 2 h bei 56 °C hitzeinaktiviert und vor Gebrauch 10 %ig (v/v) dem Flüssigmedium zugesetzt.

BSA wird als sterile 10 %ige Stammlösung in bidestilliertem Wasser bei 4 °C gelagert und dem Flüssigmedium vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Als DMEM-Medium wird grundsätzlich das Nährmedium einschließlich  $\text{NaHCO}_3$ , NEAA und Antibiotika bezeichnet. Alle anderen Zusätze (FKS, BSA) werden gesondert aufgeführt.

b) *PBS-Puffer*

Zum Waschen der Zellen wird "phosphate buffered saline" (PBS) verwendet:

8,0 g NaCl	(Merck, Nr. 6404)
0,2 g KCl	(Merck, Nr. 4936)
1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	(Sigma, Nr. S0876)
0,2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$	(Merck, Nr. 4873)

werden mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt; der pH-Wert der Lösung beträgt 7,0.

2.21.2.3 *Reagenzien*

a) *Trypsinlösung*

100 ml 0,25 %ige Trypsinlösung (Flow, Nr. 1689454) werden mit 7 ml einer 1 %igen EDTA-Lösung (in sterilem PBS-Puffer) versetzt.

b) *MTT/ $^3\text{H}$ -Thymidin-Lösung*

75 mg MTT (Dimethylthiazol-diphenyl-tetrazolium, Sigma) und 30  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Thymidin (1,11 MBq; spez. Akt. 0,67 TBq/mmol; NEN, Dreieich) werden in 30 ml Zellmedium (5 % FKS) gelöst und sterilfiltriert.

c)  *$^3\text{H}$ -Methionin-Lösung*

Für jede Multischale (2 ml Medium) werden 0,5  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Methionin (37 MBq/ml) mit 19,5  $\mu\text{l}$  Aqua dest. gemischt eingesetzt (1,85 kBq/Einheit).

#### **2.21.2.4 Subkultivierung der KB- bzw. HepG2-Zellen**

Alle im folgenden beschriebenen Arbeitsgänge erfolgen unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank, sterile Verbrauchsware, Pipetten):

1. Medium absaugen
2. 2 ml Trypsinlösung zusetzen (bei NUNC-Petrischalen, d=10 cm, Nr. 150350)
3. Nach 5 min bei 37 °C die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen pipettieren, in dem 2 ml DMEM/10 % FKS vorgelegt wurden
4. Zentrifugation bei 2.000 Upm (Labofuge 6000, Heraeus), 1 min
5. Absaugen des Überstandes, Suspendieren des Zellpellets in 5 ml DMEM/10 % FKS
6. Zentrifugation wie 4.
7. Überstand absaugen, Zellpellet in 5 ml DMEM/10 % FKS aufnehmen und auf fünf neue Petrischalen verteilen, in denen 10 ml DMEM/10 % FKS vorgelegt wurden.

#### **2.21.2.5 Einfrieren von KB- bzw. HepG2-Zellen**

Punkt 1.-6. wie unter 2.21.2.4 beschrieben

7. Pellet suspendieren in 1 ml DMEM/10 % FKS/10 % DMSO und in eine Ampulle (NUNC, Nr. 363401) pipettieren
8. Mit Einfrierstopfen (Union Carbide) auf Position "G" 2 h im Stickstoffbehälter belassen, danach alle 15 min eine Position tiefer setzen.

#### **2.21.2.6 Auftauen und Kultivierung der Zellen**

1. Ampulle aus Stickstoffbehälter entnehmen und 5 min bei 37 °C im Wasserbad erwärmen
2. Inhalt in Zentrifugenröhrchen überführen, mit 5 ml DMEM-Medium (s. 2.21.2.2) verdünnen
3. Zentrifugation bei 2.000 Upm, 1 min
4. Überstand absaugen, + 5 ml DMEM-Medium; Zellen vorsichtig mit Pasteurpipette suspendieren
5. Zentrifugation bei 2.000 Upm, 1 min
6. Überstand absaugen, mit 1 ml DMEM-Medium Zellen suspendieren, auf große Petrischalen mit 15 ml DMEM-Medium geben
7. Inkubation im Brutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C

8. Medium alle 24 h wechseln  
9. Am 3. Tag eine große Petrischale auf 4 Multischalen à 24 Einheiten) in DMEM, 1 % NEAA, 10 % FKS verteilen.

#### **2.21.2.7 Proteinbestimmung nach Lowry**

##### **Lösungen:**

- Reagenz A: 2,0 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
0,1 mol/l NaOH  
Reagenz B: 1,0 % Kalium-Natrium-Tartrat  
0,5 %  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$   
einzeln lösen, dann zusammengeben  
Reagenz C: 50 Teile Reagenz A  
+ 1 Teil Reagenz B

##### **Prüflösung:**

100 µl Probe mit 2 ml Reagenz C gut mischen und 10 min stehen lassen.  
100 µl Folin-Reagenz (Fa. Merck, Nr. 9001) zugeben, gut mischen und 30 min stehen lassen  
100 µl Triton-X-100 (1%ig in dest. Wasser) zugeben.  
Absorptionsbestimmung gegen Reagenz + Folin + Triton als Leerwert im Spektralphotometer (Beckman, Modell 34) - Wellenlänge: 660 nm

##### **Eichlösung:**

0,1 % BSA-Lsg.  
10-50 µl = 10 - 50 µg BSA/Ansatz

#### **2.21.2.8 Durchführung der Untersuchungen**

##### **2.21.2.8.1 Bestimmung der Vitalität und des Einbaus von $^3\text{H}$ -Thymidin**

Am 5. Tag nach dem Auftauen der Zellen wird eine Multischale mit 100 µl MTT/ $^3\text{H}$ -Thymidin-Lösung (mit steriler Pipette zugeben !) je MS-Einheit (1 ml Medium) versetzt und für 2 h bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert (= Kontrolle  $T_0$ ).

Die restlichen 8 Multischalen werden nach Zugabe der Substanzen (Endkonzentration Etanol = 1 %) für 24 h inkubiert.

Anschließend Zugabe von 100 µl MTT/<sup>3</sup>H-Thymidin-Lösung je MS-Einheit und Inkubation für weitere 2 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.

Inkubation ohne Substanz = Kontrolle T<sub>1</sub>

Die Reaktion wird durch Lagerung der Schalen für 30 min bei -20 °C in der Tiefkühlzelle gestoppt (Schalen nicht übereinander stapeln!).

a) MTT-Test

Die beiden inneren und die beiden äußeren Einheiten eines jeden Versuchsansatzes werden jeweils zusammengefaßt (= 2 x 2 ml), bei 2.000 Upm 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Pellet mit 2 ml 0,9 % NaCl waschen, Überstand verwerfen, Vorgang wiederholen.

Pellet mit 1,5 ml 0,9 % NaCl beschallen (10 sec, 30 W)

2 x 300 µl Aliquots entnehmen

+ 100 µl 0,3 % SDS

+ 1 ml HCl/Isopropanol

gut mischen und anschließend die Extinktion bei 570 nm gegen HCl/Isopropanol als Leerwert bestimmen.

b) <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau

Der gesamte Küvetteninhalt des MTT-Ansatzes in Szintillationsgefäße (4 ml) geben, 4 ml Szintillator (Insta-gel II, Packard) zugeben, <sup>3</sup>H-Messung im Szintillationszähler (LKB, Modell 1219).

c) Auswertung

Von den Einzelbestimmungen werden die Mittelwerte errechnet und der Einfluß von Substanzen auf die Zellvitalität (MTT-Test) und die DNS-Syntheserate (<sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau) als prozentuale Veränderung bezogen auf die Kontrolle T<sub>1</sub> angegeben. Die Kontrolle T<sub>0</sub> dient nur zur Überprüfung der Wachstumsphase während der Inkubationszeit mit Substanz, die sich aus der Differenz T<sub>1</sub> - T<sub>0</sub> ergibt.

Aufgrund schlechter Reproduzierbarkeit unter den genannten Versuchsbedingungen wird auf die Proteinbestimmungen als Bezugsgröße verzichtet.



#### **2.21.2.8.2 Bestimmung des Einbaus von $^3\text{H}$ -Methionin**

##### **a) Inkubation in Gegenwart von $^3\text{H}$ -Methionin**

Nach Substanzinkubation für 6 h bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  werden dem Medium 20  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Methionin-Lösung zugegeben und die Zellen für weitere 12-18 h bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend werden die Proben direkt aufgearbeitet oder können für eine spätere Aufarbeitung bei -20 °C eingefroren werden.

##### **b) Aufarbeitung**

- Medium abnehmen und in Zentrifugenröhrchen geben
- Zellmonolayer mit 1,5 ml warmer (37 °C) Trypsin/EDTA-Lösung von der Schale ablösen und in entsprechendes Zentrifugenröhrchen mit Medium geben
- Zentrifugation 5 min, 2.000 Upm, Tischzentrifuge
- Überstand absaugen
- Zellpellet 2 x mit eiskaltem PBS-Puffer waschen und jeweils erneut zentrifugieren
- Pellet mit 500  $\mu\text{l}$  PBS aufnehmen und 10 sec in Eisbad mit 30 W beschallen

Ein Aliquot (100  $\mu\text{l}$ ) des Zellhomogenates wird für die Proteinbestimmung eingesetzt.

Zum restlichen Zellhomogenat werden 100  $\mu\text{l}$  BSA-Lösung (20 mg/ml) als Träger-Protein zugegeben und die Proteine mit 0,5 l einer eiskalten 20 %igen TCA-Lösung ausgefällt. Nach 10 min auf Eis wird die Suspension zentrifugiert und das Proteinpellet 2mal mit 10 %iger TCA-Lösung gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Waschen des Proteinpellets wird dieses in max. 1 ml 0,5 mol/l NaOH aufgelöst und die Radioaktivität eines Aliquots dieser Lösung bestimmt.

##### **c) Auswertung**

Von den Einzelwerten werden die Mittelwerte bestimmt und der Einfluß von Substanzen auf den Einbau von  $^3\text{H}$ -Methionin in die Zellproteine als prozentuale Veränderung bezogen auf die Kontrolle angegeben.

#### **2.21.3 Ergebnisse und Diskussion**

Die mit Referenzsubstanzen und einigen repräsentativen Forschungssubstanzen an menschlichen Nasopharynx-Karzinomzellen

erzielten Ergebnisse hinsichtlich metabolischer Aktivität (MTT-Turnover) und DNS-Syntheserate ( $^3\text{H}$ -Thymidineinbau) sind in Tabelle 2.40 niedergelegt.

*Tab. 2.40: Einfluß von Referenz- und Prüfsubstanzen auf den MTT-Turnover und die DNS-Syntheserate*  
*Humane Nasopharynxkarzinomzellen (KBZ) wurden als Monolayer in MEM/ 5 % FKS/ 1 % nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA, Boehringer Mannheim) kultiviert.*

*Nach Zusatz der Testsubstanzen wurde unter Standardbedingungen 24 h inkubiert, anschliessend 100 µl MEM, welches 1 mg/ml MTT und 10 kBq/ml  $^3\text{H}$ -Thymidin enthält, zugesetzt und eine weitere Stunde inkubiert.*

*Die Zellen wurden unter Trypsineinfluß abgelöst, mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und durch Ultrasonication homogenisiert.*

*Die  $^3\text{H}$ -Radioaktivität wurde in einem Flüssigszintillationszähler (LKB, Modell 1219) quantifiziert.*

*Die Menge des durch MTT-Umsatz gebildeten blauen Formazans wurde im Spektralphotometer (Beckman, Modell 34) nach Solubilisierung des Farbstoffs aus 200 µl Zellhomogenat mit 100 µl 3 %iger Natriumdodecylsulfatlösung (SDS) und 1 ml Isopropanol/ 0,04 mol/l HCl bei 570 nm bestimmt.*

*Angaben sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.*

Substanz (1 µmol/l)	relativer MTT- Umsatz [%]	$^3\text{H}$ -Thymidin- Inkorporation [%]
Vinblastin	- 9	- 62
Vincristin	- 7	- 47
Colchicin	- 11	- 56
Cycloheximid	- 57	- 36
NAT 04-382	+ 13	- 9
NAT 05-239	- 8	+ 18
NAT 04-152	- 9	- 5
NAT 06-209	+ 9	+ 2
NAT 06-051	+ 10	+ 3
NAT 80-009	- 6	- 81
NAT 18-28711107	- 83	- 90

Während Colchicin bei allen geprüften Konzentrationen ausschließlich die Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Thymidin inhibierte, wie es aufgrund des Wirkmechanismus dieser Substanz zu erwarten

war, zeigte Cycloheximid in der höchsten Konzentration auch zytotoxische Effekte. NAT 18-28711107, eine Substanz aus einer Pflanzenzellkultur, erwies sich als stark zytotoxisch, während mit Ausnahme der stark zytostatisch wirkenden Substanz NAT 80-009 alle anderen hier repräsentativ aufgeführten Substanzen weder zytotoxische noch zytostatische Wirkung in diesem Zellsystem zeigten.

Da eine Vielzahl von Substanzpüfungen an der Hepatoma-Zelllinie HepG2 erfolgt (z.B. Bestimmung der LDL-Rezeptordichte, Synthese und Sekretion von Apoproteinen), war es sinnvoll, die zusätzliche Eignung dieser Zelllinie als Testmodell zur Untersuchung von Prüfsbstanzen auf potentiell zytotoxische bzw. zytostatische Wirkung hin zu untersuchen.

In Anlehnung an die mit der Nasopharynx-Zelllinie gewonnenen Erfahrungen wurde zunächst die Vitalität der Zellen in Abhängigkeit von der MTT-Konzentration (Abb. 2.53), die Bildung des blauen Farbstoffes in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Abb. 2.54) sowie die DNA-Syntheserate mittels des <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbaus ermittelt. Die genannten Abbildungen zeigen den Vergleich der mit HepG2-Zellen erzielten Ergebnisse mit den aus Nasopharynx-Zellen gewonnenen Daten.

Bei beiden Zelllinien läßt sich eine lineare Abhängigkeit von der MTT-Konzentration im Inkubationsmedium bis zu der höchsten geprüften Konzentration von 3,75 mg/ml Medium nachweisen (Abb. 2.53). Im Gegensatz dazu ist bei einer konstanten MTT-Konzentration von 1,5 mg/ml Medium nur bei der Hepatozyten-Zelllinie ein linearer Anstieg der Formazanbildung mit zunehmender Inkubationsdauer zu verzeichnen (Abb. 2.54). Die KB-Zellen erreichen nach ca. 90 min Inkubationsdauer bereits den Sättigungsbereich. Auffallend sind die Unterschiede hinsichtlich der Menge des gebildeten Farbstoffes aus MTT. Diese können aufgrund der Korrelation zwischen Farbstoffbildung und metabolischer Aktivität bzw. Zellzahl mit unterschiedlichen Phasen des Zellwachstums erklärt werden. Als zusätzlicher Hinweis kann die DNA-Syntheserate angesehen werden (Abb. 2.55).

Bei der Wahl geeigneter experimenteller Bedingung können daher beide Zelllinien in gleichem Maße als Testmodell für die Prüfung von Forschungssubstanzen eingesetzt werden.

Tabelle 2.41 zeigt den Einfluß von Referenzsubstanzen auf den "MTT-Turnover" sowie die DNA-Synthese in HepG2-Zellen. Sowohl Cycloheximid als auch Colchicin weisen eine dosisabhängige Hemmung der metabolischen Aktivität auf, während die DNA-Synthese nur mit Cycloheximid einer dosisabhängigen Inhibition unterliegt. Cyclophosphamid zeigt in beiden Fällen keine Wirkung. Verglichen mit den an KB-Zellen gewonnenen Ergebnissen (Tab. 2.40) ist somit ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Hemmwirkung unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen festzustellen.

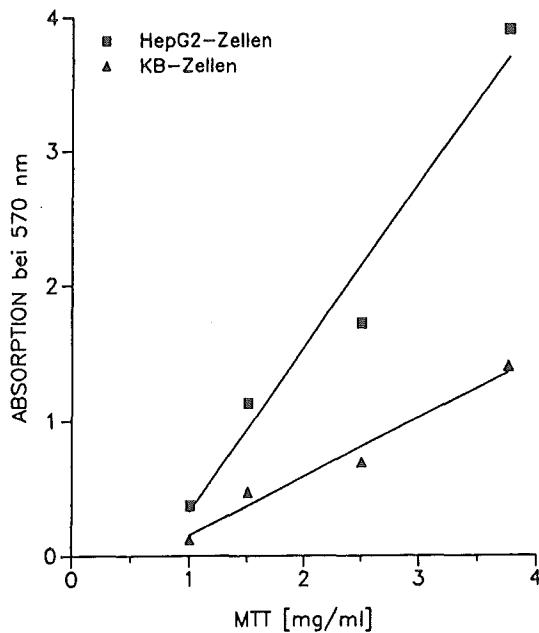
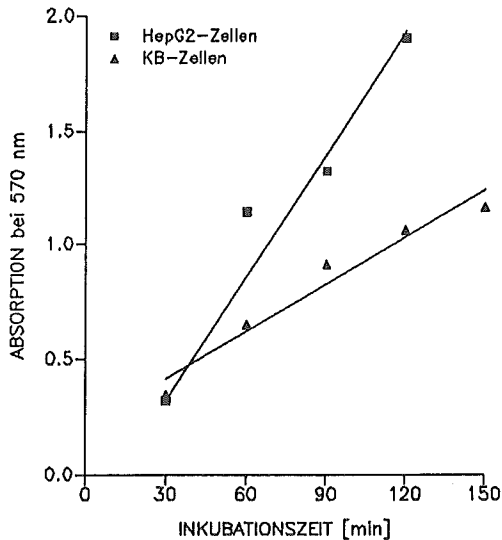


Abb. 2.53: Einfluß der MTT-Konzentration auf die Bildung von blauem Formazan in humanen Nasopharynxkarzinomzellen (KB) und in der Hepatomazelllinie HepG2. KB- bzw. HepG2-Zellen wurden in MEM/ 5 % FKS/ 1 % nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA) bzw. 10 % FKS/ 1 % NEAA für 24 h bei 37 °C als Monolayer inkubiert. 100 µl MTT-Lösung wurde zur Erreichung der angegebenen Konzentrationen zugesetzt und eine weitere Stunde inkubiert. Die Zellen wurden anschliessend unter Trypsineinfluß abgelöst und durch Ultraschallung homogenisiert. Die Menge des durch MTT-Umsatz gebildeten blauen Formazans wurde im Spektralphotometer (Beckman, Modell 34) nach Solubilisierung des Farbstoffs aus 200 µl Zellhomogenat mit 100 µl 3 %iger Natriumdodecylsulfatlösung (SDS) und 1 ml Isopropanol/ 0,04 mol/l HCl bei 570 nm bestimmt.



**Abb. 2.54:** *Einfluß der Inkubationszeit auf die Formazanbildung in KB- und HepG2-Zellen*  
*Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zur Abb. 2.53 beschrieben, durchgeführt mit der Ausnahme, daß die Inkubationszeit wie angegeben variiert und die MTT-Konzentration mit 1,5 mg/ml Medium konstant gehalten wurde.*

Für eine weitere Überprüfung der Hepatoma-Zelllinie wurde zunächst der Einbau von  $^3\text{H}$ -Methionin zur Bestimmung der Proteinbiosyntheserate untersucht. Abbildung 2.56 verdeutlicht den zeitabhängigen Verlauf der Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Methionin in die Proteinfraction von HepG2-Zellen. Der Methionin-Einbau in die TCA-fällbaren Proteine verläuft bis zu einer Inkubationsdauer von 22 h linear.

Weiterhin wurde der Einfluß von Referenzsubstanzen und einigen ausgewählten Forschungssubstanzen auf die Proteinbiosynthese in HepG2-Zellen untersucht (Tab. 2.42). Neben der Bestimmung der Radioaktivität in der TCA-fällbaren Proteinfraction wurde zusätzlich der Effekt auf die Menge Zellprotein ermittelt. Wie die Tabelle dokumentiert, konnte bei einigen

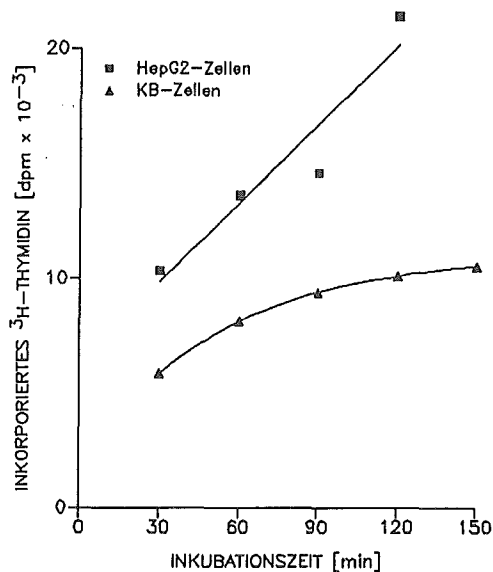


Abb. 2.55: Einfluß der Inkubationszeit auf die Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Thymidin in KB- und HepG2-Zellen. Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zur Abb. 2.53 beschrieben, durchgeführt. Anstelle der MTT-Lösung wurde jedoch  $^3\text{H}$ -Thymidin (10 kBq/ml Medium) zugesetzt. Die  $^3\text{H}$ -Radioaktivität wurde im Flüssigszintillationszähler (LKB, Modell 1219) quantifiziert.

Forschungssubstanzen eine dosisabhängige Verminderung der  $^3\text{H}$ -Methionin-Inkorporation festgestellt werden. Die Veränderung des gesamten Zellproteins korreliert gut mit den durch Radioaktivitätsmessung erhaltenen Ergebnissen.

Die im Durchschnitt etwas geringer ausfallende prozentuale Veränderung des Zellproteins läßt sich darauf zurückführen, daß dieser Marker eher zytostatische bzw. zytotoxische Wirkungen erfaßt, während die Radioaktivitätsmessung den Einfluß von Prüfsubstanzen auf die De-novo-Synthese der Proteine widerspiegelt und somit einer deutlicheren Beeinflussung unterliegt.

Tab. 2.41: Einfluß einiger Referenzsubstanzen auf den MTT-Umsatz bzw. die Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Thymidin in HepG2-Zellen.

Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zur Abb. 2.53 beschrieben, durchgeführt. 100  $\mu\text{l}$  DMEM, welches 1,5 mg MTT/ml und 10 kBq/ml  $^3\text{H}$ -Thymidin enthielt, wurde zugesetzt und 1 h inkubiert. Das solubilisierete Zellhomogenat wurde zur Bestimmung der Thymidininkorporation und des MTT-Umsatzes geteilt.

Substanz	Konz. [ $\mu\text{mol/l}$ ]	rel. MTT- Umsatz [%]	$^3\text{H}$ -Thymidin Inkorporation [%]
Cycloheximid	1	- 30	- 20
	3	- 33	- 44
	10	- 38	- 48
Colchicin	1	- 25	- 42
	3	- 35	- 38
	10	- 43	- 42
Cyclophosphamid	1	- 7	+ 13
	3	- 17	- 3
	10	- 1	+ 3

Die Ergebnisse zeigen, daß die Verminderung des Einbaus von  $^3\text{H}$ -Methionin in die Proteine von HepG2-Zellen als Maß für die Zytotoxizität von Prüfsubstanzen herangezogen werden kann. Dieser Test ermöglicht ein gut handhabbares und wenig zeit-aufwendiges Screening, um zwischen zytotoxische wirkenden und nicht-toxischen Substanzklassen zu differenzieren.

Die aus pharmakokinetischen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse über die Metabolisierung von Prüfsubstanzen ermöglichen zusätzlich die gezielte Prüfung von Metaboliten in diesem Prüfsystem, ohne zunächst auf entsprechende Tierversuche zurückgreifen zu müssen.



Tab. 2.42: Einfluß einiger Referenzsubstanzen und Substanzen aus unseren Syntheselaboratorien auf den zellulären Proteingehalt bzw. die mit Trichloressigsäure fällbare Menge inkorporierten  $^3\text{H}$ -Methionins in HepG2-Zellen.

Die Experimente wurden, wie in der Legende zur Abb. 2.56 beschrieben, durchgeführt. Die HepG2-Zellen wurden in Gegenwart der angegebenen Substanzkonzentrationen und  $^3\text{H}$ -Methionin (8,5 kBq/ ml Medium) für 20 h bei 37 °C inkubiert.

Substanz	Konz. [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$^3\text{H}$ -Methionin- Inkorporation [%]	Zellprotein [% Änderung]
Cycloheximid	1	- 72.5	- 56
	10	- 90.0	- 80
Actinomycin D	1	- 66	- 51
	10	- 98	- 92
NAT 04-152	10	- 5	+ 5
	31.6	- 7	- 6
NAT 06-209	10	- 12	+ 14
	31,6	- 5	- 6
NAT 06-210	10	- 17	+ 20
	31,6	+ 14	+ 12
NAT 04-477	10	- 11	- 12
	31,6	- 73	- 42
NAT 04-558	10	- 42	+ 34
	31,6	- 91	- 90
NAT 04-593	10	- 42	+ 28
	31,6	- 83	+ 62
NAT 18-330 11104	10	- 67	+ 44
	31,6	- 91	+ 67
NAT 20-729 11204	10	- 3	- 5
	31,6	- 7	- 12

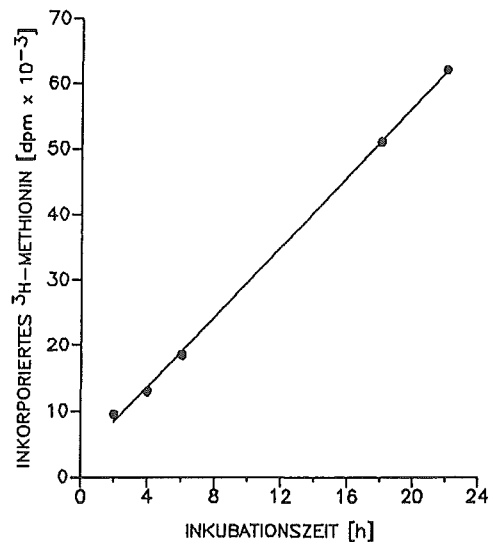


Abb. 2.56: Einfluß der Inkubationszeit auf die mit Trichlor-essigsäure fällbare Menge inkorporierten  $^3\text{H}$ -Methionins in HepG2-Zellen.

HepG2-Zellen wurden mit 2 ml DMEM/ 5 % FKS/ 1 % NEAA in Gegenwart von  $^3\text{H}$ -Methionin (9,25 kBq/ ml Medium) bei 37 °C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Zellen wurden unter Trypsineinfluß abgenommen, mit dem entsprechenden Mediumüberstand vereinigt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mehrfach mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und in 0,5 ml Endvolumen mittels Ultrabeschallung homogenisiert. 100 µl wurden zur Proteinbestimmung eingesetzt. Zum restlichen Zellhomogenat wurden 100 µl BSA-Lösung (20 mg/ml) als "Transportprotein" zugesetzt. Die Proteinfraction wurde nun durch Zusatz von 0,5 ml eiskalter 20 %iger Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert. Nach 10minütiger Inkubation der Proben im Eisbad wurde zentrifugiert, das Pellet zweimal mit 10 %iger TCA gewaschen und anschliessend in 1 ml 0,5 mol/l NaOH gelöst. Die  $^3\text{H}$ -Radioaktivität wurde im Flüssigszintillationszähler (LKB, Modell 1219) quantifiziert.

### **3. REZEPTORUNTERSUCHUNGEN ZUR AUFFINDUNG KARDIOVASKULÄR UND PSYCHOTROP WIRKSAMER SUBSTANZEN**

#### **3.1 Einführung**

Ein Schwerpunkt der Neurophysiologie in den letzten zehn Jahren war die biochemische Charakterisierung einer Reihe von spezifischen Bindungsstellen (Rezeptoren) im zentralen und peripheren Nervensystem.

Rezeptoren sind Zellmembran-gebundene Zielstrukturen für körpereigene Liganden (z.B. Neurotransmitter, Hormone). Ihre Aufgabe besteht in der Transformation der durch den Liganden übermittelten Information in eine zelluläre Antwort, wobei neben dem eigentlichen Rezeptorprotein, das den Liganden bindet, noch weitere Proteine mit teilweise enzymatischer Aktivität beteiligt sein können. Veränderungen dieser Rezeptorsysteme (Ligand-Rezeptor-zelluläre Antwort) sind Ursache einer Reihe von Erkrankungen, wie z.B. Morbus Parkinson, Chorea Huntington, endogene Depressionen, Psychosen, Schizophrenien sowie verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen.

Eine der wichtigsten Charakteristika von Rezeptoren ist deren Spezifität, d.h. die Eigenschaft, einen ganz bestimmten Liganden zu erkennen. Dieses Prinzip ist die Grundlage des Wirkmechanismus einer Reihe von Pharmaka wie z.B. von  $\alpha$ -Blockern,  $\beta$ -Blockern, Opiaten, Benzodiazepinen u.a..

Prinzipiell kann man Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten unterscheiden, d.h. Substanzen, die den physiologischen Liganden vom Rezeptor verdrängen, ohne selbst eine zelluläre Antwort auszulösen (Antagonisten), bzw. Substanzen, die die Eigenschaften physiologischer Liganden nachahmen (Agonisten). Daneben gibt es aber auch Substanzen, die zwar als Antagonisten den physiologischen Liganden vom Rezeptor verdrängen, selbst aber eine (schwächere) agonistische Aktivität haben ("intrinsic activity", ISA).

Rezeptor-Bindungsuntersuchungen ermöglichen eine relativ schnelle Auffindung von Substanzen mit potentieller antagonistischer bzw. agonistischer Aktivität. Im allgemeinen werden für diese Untersuchungen Hirnmembranen von Ratte und Rind verwendet. Im Experiment werden Tritium-markierte spezifische

Liganden zusammen mit Aliquoten der Hirnmembransuspension und dem jeweiligen "Displacer" (Verdränger, z.B. Prüfsubstanz) inkubiert. Die Trennung von gebundener und freier Radioaktivität wird durch Filtration oder Zentrifugation der Proben erreicht. Der Anteil der unspezifischen Bindung an der Gesamtbinding wird in Gegenwart eines Überschusses an nicht-markiertem Liganden ermittelt. Meßparameter der Rezeptorbindungsuntersuchungen ist die Verdrängung des spezifisch gebundenen Liganden aus der Rezeptorbindung. Die Angabe des Meßwertes kann prozentual erfolgen, bei wirksamen Reinsubstanzen aber auch durch einen  $IC_{50}$ -Wert, d.h. der Substanzkonzentration, die eine halbmaximale Inhibition der spezifischen Ligandenbindung verursacht. Der  $IC_{50}$ -Wert aus In-vitro-Untersuchungen läßt sich mit dem  $ED_{50}$ -Wert (halbmaximaler Effekt) aus Tierexperimenten vergleichen.

Arbeitsziel dieses Teilprojektes war es, für verschiedene Indikationen Rezeptor-Modelle zu entwickeln, die die Auffindung potentiell wirksamer Substanzen aus der Synthesechemie bzw. aus pflanzlichen Extrakten ermöglichen.

Eine Übersicht über das experimentelle Design ausgewählter Rezeptorbindungsuntersuchungen (Tab. 3.1) sind teilweise ausführlich in den folgenden Kapiteln beschrieben, sofern sie Gegenstand dieses Projektes waren.

Ergänzt wurden diese Modelle durch Rezeptorbindungsstudien mit atrialen natriuretischen Peptiden (ANP), die in den letzten Jahren ausgiebig pharmakologisch untersucht und diskutiert worden sind, und durch das Testsystem "Hemmung der Phosphodiesterase", das eigentlich keine Rezeptorbindungsuntersuchung darstellt, aber inhaltlich (kardiovaskuläres Indikationsgebiet) besser in dieses Kapitel als in ein anderes paßt.

Tab. 3.1: Bedingungen für die Rezeptorbindungsstudien.

Rezeptor	<sup>3</sup> H-Ligand	<sup>3</sup> H-Ligand Konz.	Gewebe Konz.	"Blank"	"Blank" Konz.	Inkubation Zeit	Temp.
		[nmol/l]	[mg/ml]		[mmol/l]	[min]	[°C]
$\alpha$ -Adreno- zeptor	Dihydroergocryptin	0,8	27,0	Adrenalin	10	30	25
$\alpha_1$ -Adreno- zeptor	Prazosin	0,5	15,0	Phentolamin	0,01	25	25
$\alpha_2$ -Adreno- zeptor	Clonidin	3,5	10,0	Phentolamin	0,1	45	25
$\beta$ -Adreno- zeptor	Dihydroalprenolol	0,30	27,0	Propranolol	0,1	30	37
Benzo- diazepin	Flunitrazepam	0,85	10,0	Diazepam	0,01	30	4
Opiat	Naloxon	0,45	7,5	Naloxon	1	15	37
Imipramin	Imipramin	0,56	10,0	Imipramin	0,1	60	4
Dopamin	Spiroperidol <sup>#</sup>	0,60	7,5	Dopamin	1	10	37
musk. Acetyl- cholin	QNB <sup>**</sup>	1,00	5,0	Atropin	0,01	60	20
Serotonin	LSD <sup>####</sup>	5,00	15,0	Serotonin	0,03	15	37
Histamin	Cimetidin	2,60	10,0	Cimetidin	1	30	4

Gewebe: Rattenhirn; mit Ausnahme <sup>#</sup> Corpus striatum\*; <sup>##</sup> frontaler Cortex\*

\* Rinderhirn; \*\* Quinuclidinylbenzylat; \*\*\* Lysergid

### **3.2 Bindungsuntersuchungen an $\alpha$ -Adrenoceptoren**

#### **3.2.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Bindungsuntersuchungen an  $\alpha$ -Adrenoceptoren werden an Rohhomogenaten des Rattenhirns durchgeführt, die durch differentielle Zentrifugation gewonnen werden. Durch die Wahl geeigneter radioaktiv markierter Liganden können Bindungsuntersuchungen Aufschluß über die Affinität von Substanzen zu  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - bzw. zur Gesamtpopulation von  $\alpha$ -Adrenoceptoren geben. Zur Ermittlung der Bindungseigenschaften von Verbindungen an der Gesamtpopulation der  $\alpha$ -Adrenoceptoren wird als nichtselektiver Ligand  $^3\text{H}$ -Dihydroergocryptin eingesetzt. Die Affinität von Substanzen zu  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren wird durch die Konzentration ausgedrückt, die eine halbmaximale Verdrängung des spezifisch gebundenen Liganden bewirkt ( $\text{IC}_{50}$ ).

Zur Bestimmung der Subtyp-Spezifität werden die selektiven Liganden  $^3\text{H}$ -WB 4101 (2,6-Dimethoxyphenoxyethyl)-aminomethyl-1,4-benzodioxane ( $\alpha_1$ -spezifisch) bzw.  $^3\text{H}$ -Prazosin sowie  $^3\text{H}$ -Clonidin ( $\alpha_2$ -spezifisch) im Bindungsexperiment eingesetzt.

Substanzen, die in diesen Untersuchungen verdrängende Eigenschaften aufweisen, sind als möglicherweise  $\alpha$ -mimetisch oder  $\alpha$ -lytisch mit entsprechender Subtyp-Spezifität einzustufen.

#### **3.2.2 Material und Methoden**

##### **3.2.2.1 Versuchstiere**

Es werden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 150-200 g verwendet.

##### **3.2.2.2 Prüfsubstanzen**

###### **a) Reinsubstanzen:**

Im Primärscreening wird eine Prüfsubstanz bei 100  $\mu\text{mol/l}$  in vier voneinander unabhängigen Experimenten auf ihre Verdrängungseigenschaften hin untersucht. Falls diese prozentualen Hemmwerte in einem pharmakologisch relevanten Bereich liegen, wird die halbmaximale Hemmkonzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) in vier Einzelexperimenten bestimmt.

*b) Extrakte aus Pflanzenzellkulturen:*

Im Primärscreening wird ein Prüfextrakt bei 100 µmol/l (Basis der Konzentrationsangabe ist ein angenommenes mittleres Molekulargewicht der Pflanzeninhaltsstoffe von 400 g/mol) in zwei voneinander unabhängigen Experimenten auf seine Verdrängungseigenschaften hin untersucht. Falls eine prozentuale Hemmung > 60 % ermittelt wird, werden Wiederholungsprüfungen bei 100 und 1 µmol/l durchgeführt .

Als Lösungsvermittler erwiesen sich Ethanol und Methanol (5 % Endkonzentration) als geeignet.

Der Substanzbedarf, ermittelt aus der eingesetzten Substanzkonzentration im Screening (100 µmol/l), dem Verdünnungsfaktor (50 µl ad 1000 µl = 1 : 20) und der Anzahl der Einzeluntersuchungen (3 x 4 = 12), beläuft sich auf 500 µl einer 2 mmol/l Substanzlösung (ca. 1 - 2 mg).

*3.2.2.3.1 Reagenzien und Puffer für die Bindung an α-Adrenozeptoren*

*a) Reagenzien:*

Adrenalin	Sigma E-4375
<sup>3</sup> H-Dihydroergocryptin (spez. Akt. 25 Ci/mmol)	NEN, NET-523)
Trizma Base	Sigma, T-1503
L(+)-Ascorbinsäure	Merck, 127
Natriumchlorid	Merck, 6404
Kaliumchlorid	Merck, 4936
Calciumchlorid	Merck, 2382
Magnesiumchlorid	Merck, 5833
Salzsäure	Riedel de Haen, 30720
Szintillator Biofluor	NEN, NEF-961

*b) Puffer:*

0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,7

0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,1

mit folgenden Zusätzen:

0,2 % Ascorbinsäure

0,12 mol/l NaCl

0,005 mol/l KCl

0,002 mol/l  $\text{CaCl}_2$

0,001 mol/l  $\text{MgCl}_2$

*3.2.2.3.2 Präparation von Rattenhirn*

Für die Gehirnpräparationen werden männliche Wistar-Ratten verwendet. Nach Dekapitieren der Ratten wird das Gehirn freipräpariert und ohne Medulla oblongata und Pons entnommen. Die Präparate werden bei - 20 °C eingefroren und innerhalb von zwei Wochen verwendet.

*3.2.2.3.3 Gewinnung von Rattenhirnmembranen*

Jeweils ein Präparat (ca. 1,5 g) wird in 20 ml eiskaltem 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,7 homogenisiert (Glashomogenisator mit Teflonpistill). Dieses Homogenat wird 10 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wird nochmals 10 min bei 39.000 x g zentrifugiert. Das daraus resultierende Membransediment wird einmal gewaschen, resuspendiert in 20 ml 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,7, 10 min bei 39.000 x g zentrifugiert und anschließend in 55 ml eiskaltem 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,1 mit folgenden Zusätzen suspendiert: 0,2 % Ascorbinsäure; 0,12 mol/l NaCl; 0,005 mol/l KCl; 0,002 mol/l  $\text{CaCl}_2$ ; 0,001 mol/l  $\text{MgCl}_2$ .

*3.2.2.3.4 Versuchsdurchführung*

Jeweils 1 ml des Membranhomogenates wird für die Verdrängungsexperimente eingesetzt. Als spezifischer Ligand wird 50 µl  $^3\text{H}$ -Dihydroergocryptin (spez. Aktivität 26 Ci/mmol; NEN, Dreieich) in einer Endkonzentration im Inkubationsansatz von 0,85 nmol/l verwendet.



Die Bestimmung des Anteils der unspezifischen Bindung an der Gesamtbindung erfolgt in Gegenwart von 50 µl Adrenalin in einer Endkonzentration von 10 mmol/l ("Blank").

Die Verdrängungseigenschaften einer Prüfsubstanz werden durch Zugabe von 50 µl zum Inkubationsansatz in den o.a. Endkonzentrationen bestimmt.

Die Inkubation der Proben erfolgt bei 25 °C im Wasserbad. Nach 30 min wird die Inkubation durch Filtration der Proben (Whatman, GF/C-Glasfaserfilter) beendet und die Filter mit 5 x 5 ml eiskaltem Homogenisationspuffer gewaschen.

Nach Überführung der Filter in Szintillationsgefäße (Minivials) und Zugabe von 4 ml Szintillator (Biofluor, NEN, Dreieich) wird die gebundene Radioaktivität in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1216, RackBeta II) bestimmt.

#### **3.2.2.4.1 Reagenzien und Puffer für die Bindung an $\alpha_1$ -Adrenozeptoren**

##### **a) Reagenzien:**

Phentolamin	Ciba-Geigy
<sup>3</sup> H-Prazosin	NEN, NET-661
(spez. Akt. 20 Ci/mmol)	
Saccharose	Merck, 7651
Magnesiumchlorid	Merck, 5833
Ascorbinsäure	Merck, 127
Trizma Base	Sigma, F-1503
Salzsäure	Riedel de Haen, 30720
Szintillator Biofluor	NEN, NEF-961

##### **b) Puffer:**

0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4

mit folgenden Zusätzen:

0,25 mol/l Saccharose

0,001 mol/l MgCl<sub>2</sub>

0,05 % Ascorbinsäure

0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4

mit folgenden Zusätzen:

0,01 mol/l MgCl<sub>2</sub>

0,05 % Ascorbinsäure

#### **3.2.2.4.2 Präparation von Rattenhirn**

Für die Gehirnpräparationen werden männliche Wistar-Ratten verwendet. Nach Dekapitieren der Ratten wird das Gehirn freipräpariert und ohne Medulla oblongata und Pons entnommen. Die Präparate werden bei - 20 °C eingefroren und innerhalb von zwei Wochen verwendet.

#### **3.2.2.4.3 Gewinnung von Rattenhirnmembranen**

Jeweils ein Präparat (ca. 1,5 g) wird in 20 ml eiskaltem 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4 mit den Zusätzen 0,25 mol/l Saccharose; 0,001 mol/l  $MgCl_2$  und 0,05 % Ascorbinsäure homogenisiert (Glashomogenisator mit Teflonpistill). Dieses Homogenat wird 10 min bei 48.000 x g zentrifugiert. Das daraus resultierende Membransediment wird einmal gewaschen, resuspendiert in 20 ml 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4 mit Zusätzen (s.o.), 10 min bei 48.000 x g zentrifugiert und anschließend in 100 ml eiskaltem 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4 mit den Zusätzen 0,01 mol/l  $MgCl_2$  und 0,05 % Ascorbinsäure suspendiert.

#### **3.2.2.4.4 Versuchsdurchführung**

Jeweils 1 ml dieses Membranhomogenats wird für die Verdrängungsexperimente eingesetzt. Als spezifischer Ligand wird 50 µl  $^3H$ -Prazosin (spez. Akt. 20 Ci/mmol; NEN, Dreieich) in einer Endkonzentration im Inkubationsansatz von 0,5 nmol/l verwendet.

Die Bestimmung des Anteils der unspezifischen Bindung an der Gesamtbindung erfolgt in Gegenwart von 50 µl Phentolamin in einer Endkonzentration von 10 µmol/l ("Blank").

Die Verdrängungseigenschaften einer Prüfsubstanz werden durch Zugabe von 50 µl in den o.a. Endkonzentrationen zum Inkubationsansatz bestimmt.

Die Inkubation der Proben erfolgt bei 25 °C im Wasserbad. Nach 25 min wird die Inkubation durch Filtration der Proben (Whatman, GF/C-Glasfaserfilter) beendet und die Filter mit 4 x 5 ml eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen.

Nach Überführung der Filter in Szintillationsgefäße (Minivials) und Zugabe von 4 ml Szintillator (Biofluor, NEN, Dreieich) wird die gebundene Radioaktivität in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1216, RackBeta II) bestimmt.

#### **3.2.2.5.1 Reagenzien und Puffer für die Bindung an $\alpha_2$ -Adrenozeptoren**

##### **a) Reagenzien:**

Phentolamin	Ciba-Geigy
<sup>3</sup> H-Clonidin	Amersham, TRK.621
(spez. Akt. 21 Ci/mmol)	
Trizma Base	Sigma, T1503
Salzsäure	Riedel de Haen, 30720
Szintillator Biofluor	NEN, NEF-961

##### **b) Puffer:**

0,05 mmol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,7

#### **3.2.2.5.2 Gewinnung von Rattenhirnmembranen**

Jeweils ein Präparat (ca. 1,5 g) wird in 20 ml eiskaltem 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,7 homogenisiert (Glashomogenisator mit Teflonpistill). Dieses Homogenat wird 10 min bei 48.000 x g zentrifugiert. Das daraus resultierende Membransediment wird einmal gewaschen (resuspendiert in 20 ml 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,7, 10 min bei 48.000 x g zentrifugiert) und anschließend in 100 ml eiskaltem 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,7 suspendiert.

#### **3.2.2.5.3 Versuchsdurchführung**

Jeweils 1 ml dieses Membranhomogenats wird für die Verdrängungsexperimente eingesetzt. Als spezifischer Ligand werden 50 µl <sup>3</sup>H-Clonidin (spez. Akt. 21 Ci/mmol; Amersham, Braunschweig) in einer Endkonzentration im Inkubationsansatz von 3,5 nmol/l verwendet.

Die Bestimmung des Anteils der unspezifischen Bindung an der Gesamtbindung erfolgt in Gegenwart von 50 µl Phentolamin in einer Endkonzentration von 100 µmol/l ("Blank").

Die Verdrängungseigenschaften einer Prüfsubstanz werden durch Zugabe von 50 µl zum Inkubationsansatz in den o.a. Endkonzentrationen bestimmt.

Die Inkubation der Proben erfolgt bei 25 °C im Wasserbad. Nach 45 min wird die Inkubation durch Filtration der Proben (Whatman, GF/B-Glasfaserfilter) beendet und die Filter mit 4 x 5 ml eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen.

Nach Überführung der Filter in Szintillationsgefäße (Minivials) und Zugabe von 4 ml Szintillator (Biofluor, NEN, Dreieich) wird die gebundene Radioaktivität in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1216, RackBeta II) bestimmt.

### **3.2.2.6 Auswertung**

Die Ermittlung aller Einzeldaten erfolgt durch Dreifachbestimmung.

Die Ermittlung der Einzelwerte erfolgt auf der Basis der cpm (counts per minute)-Bestimmung und Mittelwertbildung der Dreifachbestimmung. Als spezifische Bindung ist die Differenz zwischen den Meßwerten der Gesamtbindung und der Bindung in Anwesenheit des "Blank" definiert. Die Meßwerte von Prüfsubstanzen werden um den "Blankmeßwert" korrigiert und bezogen auf die spezifische Bindung (100 %) als Prozentwert ausgerechnet.

Als Hemmwirkung einer Prüfsubstanz wird die Differenz des Prozentwertes der  $^3\text{H}$ -Ligandenbindung in Gegenwart der Prüfsubstanz zur spezifischen Bindung angegeben.

IC<sub>50</sub>-Werte werden auf der Basis der prozentualen Hemmwerte der Einzelkonzentrationen (0,1, 0,3, 1, 3, 10 und 30 x 10<sup>-x</sup> mol/l) mittels einer log-probit-Analyse graphisch ermittelt. Aus vier unabhängigen Einzelbestimmungen wird der mittlere IC<sub>50</sub>-Wert ( $\bar{x} \pm s_x$ ) errechnet.

### **3.2.3 Ergebnisse und Diskussion**

Tabelle 3.2 faßt die Ergebnisse zusammen, die in den Bindungsuntersuchungen mit verschiedenen Referenzsubstanzen ermittelt worden sind. Durch Verwendung subtypisch-spezifischer

scher Liganden (WB 4101 für  $\alpha_1$ ; Clonidin für  $\alpha_2$ ) lassen sich Aussagen über die Spezifität der untersuchten Verbindungen treffen.

Tab. 3.2: Affinität verschiedener Wirkstoffe zum  $\alpha$ -Adrenozeptor

Die Konzentration der verdrängenden Substanz, welche die spezifische Rezeptorbindung um 50 % zu inhibieren vermag ( $IC_{50}$ -Wert), wurde mittels der "log-probit-Analyse" aus 6 verschiedenen Konkurrentorkonzentrationen ermittelt.

Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 unabhängigen Bestimmungen.

Inhibitor	$\alpha$		$IC_{50}$ -Wert [nmol/l]		$\alpha_2$	
			$\alpha_1$			
( $\pm$ )-Lofexidin	55 $\pm$	12	1000 $\pm$	230	7,3 $\pm$	0,7
(+)-Lofexidin	430 $\pm$	70	3500 $\pm$	700	43,0 $\pm$	7,0
(-)-Lofexidin	21 $\pm$	3	2200 $\pm$	600	3,6 $\pm$	0,5
Clonidin	75 $\pm$	10	7500 $\pm$	180	20,5 $\pm$	2,0
Prazosin	770 $\pm$	190	320 $\pm$	90	14000,0 $\pm$	2000,0
Yohimbin	100 $\pm$	40	3700 $\pm$	700	520,0 $\pm$	70,0
Adrenalin	2100 $\pm$	160	29000 $\pm$	10000	7,0 $\pm$	2,0
Noradrenalin	3900 $\pm$	970	45000 $\pm$	7000	48,0 $\pm$	9,0
Monoxidin	6500 $\pm$	900	100000 $\pm$	20000	85,0 $\pm$	5,0
Isoprenalin	95000 $\pm$	10000	150000 $\pm$	60000	9000,0 $\pm$	1700,0

Weiterführende Untersuchungen ergaben, daß  $^3H$ -Prazosin eine größere Spezifität gegenüber  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren aufweist als  $^3H$ -WB 4101. Aus diesem Grund wurde während der Projektlaufzeit das Testverfahren auf  $^3H$ -Prazosin umgestellt und die für diesen Liganden optimalen Bedingungen ermittelt.

Unter Verwendung steigender Konzentrationen von  $^3H$ -Prazosin wurde im Rattenhirnhomogenat eine maximale Anzahl von  $\alpha_1$ -adrenergen Bindungsstellen von  $74,6 \pm 4$  fmol/mg Protein ( $b_{max}$ ) mit einer apparenten Dissoziationskonstanten von  $0,38$  nmol/l ( $K_D$ ) ermittelt (Abb. 3.1A und B).

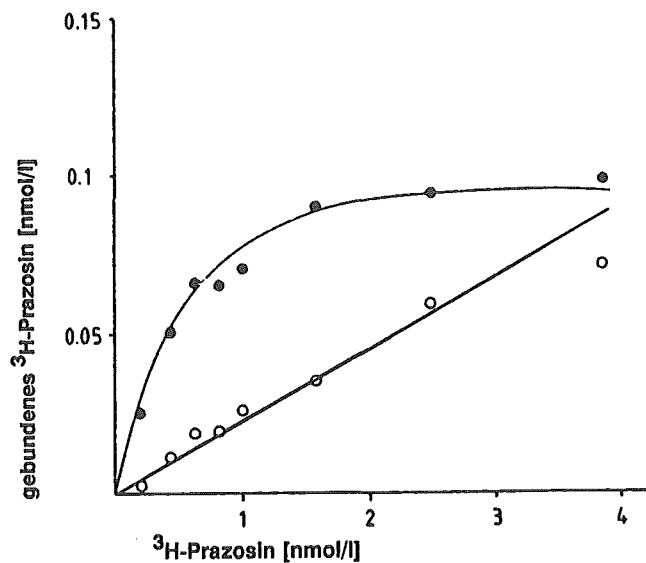


Abb. 3.1A: Sättigung der spezifischen  $^3\text{H}$ -Prazosin-Bindung an Rattenhirnmembranen  
 Die  $^3\text{H}$ -Prazosinbindung wurde dem nach Standardprotokoll bei verschiedenen Konzentrationen des Radioliganden bestimmt. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart eines Überschusses Phentolamin bestimmt. Angegeben sind Daten eines repräsentativen Experimentes.

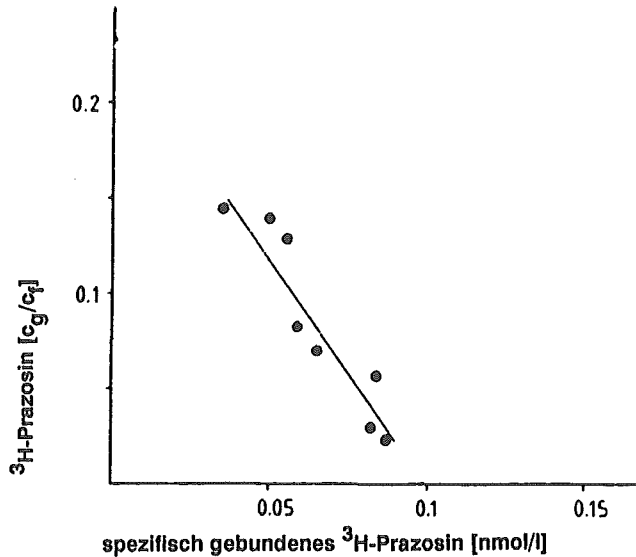


Abb. 3.1B: Scatchardanalyse der spezifischen  $^3\text{H}$ -Prazosin-bindungsdaten aus Abb. 3.1A.

Die Verwendung von Phentolamin als  $^3\text{H}$ -Prazosin-verdrängende Substanz ergab eine halbmaximale Inhibition der spezifischen  $^3\text{H}$ -Prazosin-Bindung von  $51,5 \pm 9,4 \text{ nmol/l}$  ( $\text{IC}_{50}$ -Wert).

Die Pharmakotherapie eines erhöhten Blutdrucks ist u.a. mit Substanzen möglich, die an zentrale  $\alpha_2$ -Rezeptoren binden und Agonisten darstellen. Unter diesen Verbindungen befinden sich, wie Tabelle 3.3 zeigt, Clonidin, das Lofexidin-Racemat (( $\pm$ )-Lofexidin) und die beiden Enantiomeren (+)-Lofexidin und (-)-Lofexidin.

Um die in vitro gemessenen Werte mit in vivo erhobenen Befunden korrelieren zu können, wurde der Einfluß dieser Verbindungen auf das Herz-Kreislauf-System in vivo untersucht. Die blutdrucksenkende und bradykarde Wirkung der Substanzen wurde dabei an narkotisierten normotensiven Ratten geprüft, wobei als Meßparameter der mittlere arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz dienten. Die periphere  $\alpha$ -mimetische Wirksamkeit wurde an der despinalisierten Ratte getestet, bei der nach Ausschaltung des zentralen Nervensystems  $\alpha_2$ -Agonisten über eine periphere Vasokonstriktion eine Blutdruckerhöhung verursachen. Die in Tab. 3.3 zusammengestellten Ergebnisse der In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen zeigen die gute Korrelation der Meßwerte. Trotz der geringen Anzahl der geprüften Referenzsubstanzen wird deutlich, daß Rezeptorbindungsuntersuchungen an  $\alpha$ -Rezeptoren u.a. für das Screening potentieller zentral wirksamer Antihypertensiva geeignet sind.

Tab. 3.3: Affinität zum  $\alpha$ -Adrenozeptor und kardiovaskuläre Wirkung von Clonidin, Lofexidin und dessen Enantiomere

Die Konzentration der verdrängenden Substanz, welche die spezifische Rezeptorbindung um 50 % zu inhibieren vermag ( $IC_{50}$ -Wert), wurde mittels der "log-probit-Analyse" aus 6 verschiedenen Konkurrentkonzentrationen ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 unabhängigen Bestimmungen. Zur Bewertung der hypotensiven Potenz einer Substanz wurde die Dosis kalkuliert, welche den mittleren arteriellen Blutdruck in anästhesierten, normotensiven Ratten um 25 % senkt ( $ED_{25}$ -Wert). Die bradykarde Substanzwirkung wurde als die Dosis bestimmt, welche die Herzfrequenz um 15 % im oben erwähnten Modell senkt ( $ED_{15}$ -Wert). Die hypertensive Wirkung wurde als Dosis, welche den mittleren arteriellen Blutdruck in Ratten um 60 mm Quecksilbersäule erhöht, kalkuliert.

Substanz	$\alpha_2$ -Rezeptor $IC_{50}$	hypot. $ED_{25}$	bradykard. $ED_{15}$	hypert. $ED_{50}$
			[nmol/l]	
( $\pm$ )-Lofexidin	7,3	3,0	1,2	12,5
(-)-Lofexidin	3,6	1,5	0,7	5,0
(+)-Lofexidin	43,0	>> 10	13,8	107,8
Clonidin	20,5	2,4*	3,1*	4,6*

\* Timmermans und van Zwieten (1980)



### **3.3 Bindungsuntersuchungen an $\beta$ -Adrenoceptoren**

#### **3.3.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Die Bindungseigenschaften von Substanzen an  $\beta$ -Adrenoceptoren werden in Verdrängungsexperimenten an Rattenhirnhomogenaten bestimmt. Als spezifischer Ligand wird  $^3\text{H}$ -CGP (4-(3-t-Butyl-amino-2-hydroxypropoxyl)-5,7- $^3\text{H}$  benzimidazol-2-one) eingesetzt. Die Bestimmung des Anteils an unspezifischer Bindung erfolgt in Anwesenheit von Propranolol ( $10^{-4}$  mol/l) im Inkubationsmedium.

Substanzen, die in diesem Modell wirksam sind und antagonistische Eigenschaften haben, werden als sogenannte  $\beta$ -Blocker bei kardiovaskulären Erkrankungen und besonders bei erhöhtem Blutdruck therapeutisch eingesetzt.

#### **3.3.2 Material und Methoden**

##### **3.3.2.1 Versuchstiere**

Es werden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 150-200 g verwendet.

##### **3.3.2.2 Prüfsubstanzen**

###### **a) Reinsubstanzen:**

Im Primärscreening wird eine Prüfsubstanz bei 100  $\mu\text{mol/l}$  in vier voneinander unabhängigen Experimenten auf ihre Verdrängungseigenschaften hin untersucht. Falls diese prozentualen Hemmwerte in einem pharmakologisch relevanten Bereich liegen, wird die halbmaximale Hemmkonzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) in vier Einzelexperimenten bestimmt.

###### **b) Extrakte aus Pflanzenzellkulturen:**

Im Primärscreening wird ein Prüfextrakt bei 100  $\mu\text{mol/l}$  (Basis der Konzentrationsangabe ist ein angenommenes mittleres Molekulargewicht der Pflanzeninhaltsstoffe von 400 g/mol) in zwei voneinander unabhängigen Experimenten auf seine Verdrängungseigenschaften hin untersucht. Falls eine prozentuale Hemmung  $> 60 \%$  ermittelt wird, werden Wiederholungsprüfungen bei 100 und 1  $\mu\text{mol/l}$  durchgeführt .

Als Lösungsvermittler erwiesen sich Ethanol und Methanol (5 % Endkonzentration) als geeignet.

Der Substanzbedarf, ermittelt aus der eingesetzten Substanzkonzentration im Screening (100  $\mu\text{mol/l}$ ), dem Verdünnungsfaktor (50  $\mu\text{l}$  ad 1000  $\mu\text{l}$  = 1 : 20) und der Anzahl der Einzeluntersuchungen (3 x 4 = 12), beläuft sich auf 500  $\mu\text{l}$  einer 2 mmol/l Substanzlösung (ca. 1 - 2 mg).

### 3.3.2.3 Reagenzien und Puffer

#### a) Reagenzien:

Propranolol	Sigma, P-0884
$^3\text{H}$ -CGP-12177 (spez. Akt. 38 Ci/mmol)	Amersham Buchler
Trizma Base	Sigma, T-1503
L(+)-Ascorbinsäure	Merck, 127
Natriumchlorid	Merck, 6404
Kaliumchlorid	Merck, 4936
Calciumchlorid	Merck, 2382
Magnesiumchlorid	Merck, 5833
Salzsäure	Riedel de Haen, 30720
Szintillator Biofluor	NEN, NEF-961

#### b) Puffer:

0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,7

0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,1

mit folgenden Zusätzen:

0,2 % Ascorbinsäure

0,12 mol/l NaCl

0,005 mol/l KCl

0,002 mol/l  $\text{CaCl}_2$

0,001 mol/l  $\text{MgCl}_2$

### 3.3.2.4 Präparation von Rattenhirn

Für die Gehirnpräparationen werden männliche Wistar-Ratten verwendet. Nach Dekapitieren der Ratten wird das Gehirn freipräpariert und ohne Medulla oblongata und Pons entnommen. Die Präparate werden bei - 20 °C eingefroren und innerhalb von zwei Wochen verwendet.

### **3.3.2.5 Gewinnung von Rattenhirnmembranen**

Jeweils ein Präparat (ca. 1,5 g) wird in 20 ml eiskaltem 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,7 homogenisiert (Glashomogenisator mit Teflonpistill). Dieses Homogenat wird 10 min bei 48.000 x g zentrifugiert. Das daraus resultierende Membransediment wird einmal gewaschen (resuspendiert in 20 ml 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,7, 10 min bei 48.000 x g zentrifugiert) und anschließend in 100 ml eiskaltem 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,7 suspendiert.

### **3.3.2.6 Versuchsdurchführung**

Jeweils 1 ml dieses Membranhomogenats wird für die Verdrängungsexperimente eingesetzt. Als spezifischer Ligand wird  $^3\text{H}$ -CGP-12177 (spez. Akt. 38 Ci/mmol; Amersham, Braunschweig) in einer Endkonzentration im Inkubationsansatz von 0,6 nmol/l verwendet.

Die Bestimmung des Anteils der unspezifischen Bindung an der Gesamtbindung erfolgt in Gegenwart von 50  $\mu\text{l}$  Phentolamin in einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  ("Blank").

Die Verdrängungseigenschaften einer Prüfsubstanz werden durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  zum Inkubationsansatz in den o.a. Endkonzentrationen bestimmt.

Die Inkubation der Proben erfolgt bei 25 °C im Wasserbad. Nach 45 min wird die Inkubation durch Filtration der Proben (Whatman, GF/C-Glasfaserfilter) beendet und die Filter mit 4 x 5 ml eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen.

Nach Überführung der Filter in Szintillationsgefäße (Minivials) und Zugabe von 4 ml Szintillator (Biofluor, NEN, Dreieich) wird die gebundene Radioaktivität in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1216, RackBeta II) bestimmt.

### **3.3.2.7 Auswertung**

Die Ermittlung aller Einzeldaten erfolgt durch Dreifachbestimmung.

Die Ermittlung der Einzelwerte erfolgt auf der Basis der cpm (counts per minute)-Bestimmung und Mittelwertbildung der Dreifachbestimmung. Als spezifische Bindung ist die Differenz zwischen den Meßwerten der Gesamtbindung und der Bindung in Anwesenheit des "Blank" definiert. Die Meßwerte von Prüfsubstanzen werden um den "Blankmeßwert" korrigiert und bezogen auf die spezifische Bindung (100 %) als Prozentwert ausgerechnet.

Als Hemmwirkung einer Prüfsubstanz wird die Differenz des Prozentwertes der  $^3\text{H}$ -Ligandenbindung in Gegenwart der Prüfsubstanz zur spezifischen Bindung angegeben.

$\text{IC}_{50}$ -Werte werden auf der Basis der prozentualen Hemmwerte der Einzelkonzentrationen (0,1, 0,3, 1, 3, 10 und  $30 \times 10^{-x}$  mol/l) mittels einer log-probit Analyse graphisch ermittelt. Aus vier unabhängigen Einzelbestimmungen wird der mittlere  $\text{IC}_{50}$ -Wert ( $\bar{x} \pm s_x$ ) errechnet.

### ***3.3.3 Ergebnisse und Diskussion***

Eine Reihe von Referenzsubstanzen, darunter auch Verbindungen mit  $\alpha$ -antagonistischen Eigenschaften, wurde in diesem Testmodell geprüft (Tab. 3.4). Für Propranolol und Isoprenalin wurden  $\text{IC}_{50}$ -Werte von  $4,4 \pm 0,6$  nmol/l bzw.  $1,5 \pm 0,4$   $\mu\text{mol/l}$  bestimmt. Dieses Modell wurde in der Frühphase des Projekts entwickelt; da in unserer Forschung kein Interesse an Verbindung mit  $\beta$ -agonistischen und  $\beta$ -antagonistischen Eigenschaften bestand, wurde dieses Prüfsystem anschließend nur noch zum Nachweis der fehlenden Affinität zu  $\beta$ -Rezeptoren herangezogen, um das pharmakologische Profil von Substanzen mit anderen Wirkqualitäten zu vervollständigen. Für diese Fragestellung war die nähere Spezifikation ( $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -Rezeptoren) irrelevant.

**Tab. 3.4: Affinität verschiedener Wirkstoffe zum  $\beta$ -Adrenozeptor**  
 Die Konzentration der verdrängenden Substanz, welche die spezifische Rezeptorbindung um 50 % zu inhibieren vermag ( $IC_{50}$ -Wert), wurde mittels der "log-probit-Analyse" aus 6 verschiedenen Konkurrentkonzentrationen ermittelt.  
 Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 unabhängigen Bestimmungen.

Inhibitor	$IC_{50}$ -Wert [nmol/l]		
( $\pm$ )-Lofexidin	370000	$\pm$	40000
(+)-Lofexidin	510000	$\pm$	90000
(-)-Lofexidin	150000	$\pm$	10000
Clonidin	> 1000000		
Prazosin	16000	$\pm$	3000
Yohimbin	568000	$\pm$	178000
Adrenalin	7600	$\pm$	1300
Noradrenalin	7800	$\pm$	2100
Monoxidin	300000	$\pm$	50000
Isoprenalin	1500	$\pm$	400
Propranolol	4,4	$\pm$	0,6

### **3.4 Bindungsuntersuchungen an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren**

#### **3.4.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Die Bindungsuntersuchungen an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren werden an Membranhomogenaten des Rattenhirns durchgeführt, die durch differentielle Zentrifugation gewonnen werden. Durch Tritium-markiertes Quinuclidinylbenzylat ( $^3\text{H}$ -QNB) können die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren im Hirnhomogenat spezifisch nachgewiesen werden. Die Verdrängung des spezifisch gebundenen  $^3\text{H}$ -QNB aus dessen Rezeptorbindung durch unmarkierte Prüfsubstanzen gibt Aufschluß über die Rezeptor-Affinität.

Die Affinitäten von Prüfsubstanzen zum muskarinischen Acetylcholinrezeptor wird durch die Konzentration ausgedrückt, die eine halbmaximale Hemmung der spezifischen  $^3\text{H}$ -QNB-Bindung bewirkt ( $\text{IC}_{50}$ ).

Verbindungen, die in diesen Untersuchungen verdrängende Eigenschaften aufweisen, sind als möglicherweise cholinergisch oder anticholinergisch wirksam einzustufen.

#### **3.4.2 Material und Methoden**

##### **3.4.2.1 Versuchstiere**

Es werden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 150-200 g verwendet.

##### **3.4.2.2 Prüfsubstanzen**

###### **a) Reinsubstanzen:**

Im Primärscreening wird eine Prüfsubstanz bei 100  $\mu\text{mol/l}$  in vier voneinander unabhängigen Experimenten auf ihre Verdrängungseigenschaften hin untersucht. Falls diese prozentualen Hemmwerte in einem pharmakologisch relevanten Bereich liegen, wird die halbmaximale Hemmkonzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) in vier Einzelexperimenten bestimmt.

*b) Extrakte aus Pflanzenzellkulturen:*

Im Primärscreening wird ein Prüfextrakt bei 100 µmol/l (Basis der Konzentrationsangabe ist ein angenommenes mittleres Molekulargewicht der Pflanzeninhaltsstoffe von 400 g/mol) in zwei voneinander unabhängigen Experimenten auf seine Verdrängungseigenschaften hin untersucht. Falls eine prozentuale Hemmung > 60 % ermittelt wird, werden Wiederholungsprüfungen bei 100 und 1 µmol/l durchgeführt .

Als Lösungsvermittler erwiesen sich Ethanol und Methanol (5 % Endkonzentration) als geeignet.

Der Substanzbedarf, ermittelt aus der eingesetzten Substanzkonzentration im Screening (100 µmol/l), dem Verdünnungsfaktor (50 µl ad 1000 µl = 1 : 20) und der Anzahl der Einzeluntersuchungen (3 x 4 = 12), beläuft sich auf 500 µl einer 2 mmol/l Substanzlösung (ca. 1 - 2 mg).

*3.4.2.3 Reagenzien und Puffer*

*a) Reagenzien:*

Atropin(-sulfat)	Merck, 1576
<sup>3</sup> H-QNB (Quinuclidinyl-Benzylat)	NEN, NET-656
(spez. Akt. 39 Ci/mmol)	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, 4873
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, 6580
Szintillator Biofluor	NEN, NEF-961

*b) Puffer:*

0,066 mol/l Na-K-Phosphat-Puffer pH 7,4

*3.4.2.4 Präparation von Rattenhirn*

Für die Gehirnpräparationen werden männliche Wistar-Ratten verwendet. Nach Dekapitieren der Ratten wird das Gehirn freipräpariert und ohne Medulla oblongata und Pons entnommen. Die Präparate werden bei - 20 °C eingefroren und innerhalb von zwei Wochen verwendet.

*3.4.2.5 Gewinnung von Rattenhirnmembranen*

Jeweils ein Präparat (ca. 1,5 g) wird in 20 ml eiskaltem 0,066 mol/l Na-K-Phosphat-Puffer pH 7,4 homogenisiert (Glas-

homogenisator mit Teflonpistill). Dieses Homogenat wird 10 min bei 48.000 x g zentrifugiert. Das daraus resultierende Membransediment wird in 300 ml eiskaltem 0,066 mol/l Na-K-Phosphat-Puffer pH 7,4 suspendiert.

#### **3.4.2.6 Versuchsdurchführung**

Jeweils 1 ml dieses Membranhomogenats wird für die Verdrängungsexperimente eingesetzt. Als spezifischer Ligand werden 50 µl <sup>3</sup>H-QNB (spez. Akt. 39 Ci/mmol; NEN, Dreieich) in einer Endkonzentration im Inkubationsansatz von 1 nmol/l verwendet.

Die Bestimmung des Anteils der unspezifischen Bindung an der Gesamtbindung erfolgt in Gegenwart von 50 µl Atropin in einer Endkonzentration von 10 µmol/l ("Blank").

Die Verdrängungseigenschaften einer Prüfsubstanz werden durch Zugabe von 50 µl Substanzlösung zum Inkubationsansatz in den o.a. Endkonzentrationen bestimmt.

Die Inkubation der Proben erfolgt bei 20 °C im Wasserbad. Nach 60 min wird die Inkubation durch Filtration der Proben (Whatman, GF/B-Glasfaserfilter) beendet und die Filter mit 3 x 3 ml eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen.

Nach Überführung der Filter in Szintillationsgefäße (Minivials) und Zugabe von 4 ml Szintillator (Biofluor, NEN, Dreieich) wird die gebundene Radioaktivität in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1216, RackBeta II) bestimmt.

#### **3.4.2.7 Auswertung**

Die Ermittlung aller Einzeldaten erfolgt durch Dreifachbestimmung.

Die Ermittlung der Einzelwerte erfolgt auf der Basis der cpm (counts per minute)-Bestimmung und Mittelwertbildung der Dreifachbestimmung. Als spezifische Bindung ist die Differenz zwischen den Meßwerten der Gesamtbindung und der Bindung in Anwesenheit des "Blank" definiert. Die Meßwerte von Prüfsubstanzen werden um den "Blankmeßwert" korrigiert und bezogen auf die spezifische Bindung (100 %) als Prozentwert ausgerechnet.



Als Hemmwirkung einer Prüfsubstanz wird die Differenz des Prozentwertes der  $^3\text{H}$ -Ligandenbindung in Gegenwart der Prüfsubstanz zur spezifischen Bindung angegeben.

$\text{IC}_{50}$ -Werte werden auf der Basis der prozentualen Hemmwerte der Einzelkonzentrationen (0,1, 0,3, 1, 3, 10 und  $30 \times 10^{-x}$  mol/l) mittels einer log-probit-Analyse graphisch ermittelt. Aus vier unabhängigen Einzelbestimmungen wird der mittlere  $\text{IC}_{50}$ -Wert ( $\bar{x} \pm s_x$ ) errechnet.

### 3.4.3 Ergebnisse und Diskussion

Dieses Modell wurde zunächst für Untersuchungen zur Rezeptorspezifität trizyklischer Antidepressiva eingesetzt, um die anticholinergen Nebenwirkungen dieser Therapeutikagruppe über deren Affinität zu den muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren abzuschätzen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

**Tab. 3.5: Affinität einiger Antidepressiva zum muskarinischen Acetylcholinrezeptor.**

*Die Konzentration der verdrängenden Substanz, welche die spezifische Rezeptorbindung um 50 % zu inhibieren vermag ( $\text{IC}_{50}$ -Wert), wurde mittels der "log-probit-Analyse" aus 6 verschiedenen Konkurrentkonzentrationen ermittelt.*

*Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 unabhängigen Bestimmungen.*

Inhibitor	$\text{IC}_{50}$ -Wert [ $\mu\text{mol/l}$ ]		
Amitriptylin	0,32	$\pm$	0,02
Amitriptylinoxid	18,0	$\pm$	5,0
Nortriptylin	1,2	$\pm$	0,1
Imipramin	1,1	$\pm$	0,2
Desimipramin	4,4	$\pm$	0,6
Zimeldin	54,0	$\pm$	7,0
Nomifensin	640	$\pm$	70
Mianserin	3,5	$\pm$	0,6
Atropin	0,0062	$\pm$	0,0003

Interessant ist insbesondere die deutlich geringere Affinität von Amitriptylinoxid als von Amitriptylin zu cholinergen Rezeptoren. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit

den Erfahrungen aus klinischen Untersuchungen, nach denen nach Gabe von Amitriptylinoxid geringere Nebenwirkungen wie Mundtrockenheit aufgetreten sind.

In gleicher Weise wurde eine Reihe von neuroleptisch wirksamen Verbindungen untersucht, um über deren Bindungseigenschaften an diesem Rezeptor ebenfalls Aussagen über das Nebenwirkungspotential (insbesondere extrapyramidal-motorische Störungen) machen zu können. Daneben sollte durch vergleichende Untersuchungen am Magnus-Darm (isoliertes Ileum des Meerschweinchens) eine Korrelation der in vitro mit den ex vivo erhobenen Daten hergestellt werden.

Wie aus Tabelle 3.6 hervorgeht, besitzt das Standardneuroleptikum Haloperidol fast keine Affinität zu muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren, wogegen Thioridazin, Sulforidazin sowie die Neuentwicklung Clopipazan  $IC_{50}$ -Werte unter  $1 \mu\text{mol/l}$  aufweisen. Ein Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte mit den Effekten dieser Substanzen auf die Acetylcholinwirkung am Magnus-Darm zeigt, daß die im Verdrängungsexperiment wirksamen Substanzen als anticholinergisch zu charakterisieren sind.

*Tab. 3.6: Affinität einiger neuroleptischer Wirkstoffe zum muskarinischen Acetylcholinrezeptor des Rattenhirns. Die Konzentration der verdrängenden Substanz, welche die spezifische Rezeptorbindung um 50 % zu inhibieren vermag ( $IC_{50}$ -Wert), wurde mittels der "log-probit-Analyse" aus 6 verschiedenen Kompetitorkonzentrationen ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten, wobei jeweils eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt wurde.*

Inhibitor	$IC_{50}$ -Wert [ $\mu\text{mol/l}$ ]		
Chlorpromazin	1,7	$\pm$	0,3
Clopi-pazan	0,69	$\pm$	0,05
Haloperidol	37,0	$\pm$	3,0
Promethazin	0,064	$\pm$	1,6
Chlorprothixen	0,19	$\pm$	0,04
Fluphenazin	6,6	$\pm$	1,1
Thioridazin	0,18	$\pm$	0,04
Sulforidazin	0,21	$\pm$	0,04
Clopamid	650,0	$\pm$	50,0
Flupentixol	74,0	$\pm$	13
Benperidol	3,4	$\pm$	0,3

Eine Korrelation zwischen  $IC_{50}$ -Werten im Verdrängungsexperiment (Tab. 3.6) und den  $ED_{50}$ -Werten am isolierten Ileum (Tab. 3.7) ergibt einen Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,9839$  (siehe Abb. 3.2).

*Tab. 3.7: Effekt von Neuroleptika auf den Acetylcholineffekt am isolierten Ileum des Meerschweinchens*  
*Die Konzentration der Substanz, welche die Acetylcholinreaktion um 50 % zu inhibieren vermag ( $ED_{50}$ -Wert), wurde mittels der "log-probit-Analyse" aus 3 verschiedenen Substanzkonzentrationen ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte von 6 unabhängigen Experimenten.*

Substanz	$ED_{50}$ -Wert [ $\mu\text{mol/l}$ ]
Chlorpromazin	9,0
Clopipazan	11,0
Haloperidol	88,0
Promethazin	0,96
Chlorprothixen	9,0
Fluphenazin	30,0
Thioridazin	15,0
Sulforidazin	4,2
Clopamid	> 100,0
Flupentixol	n.b.
Benperidol	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

Die durchgeführten Untersuchungen belegen, daß mit Hilfe von Verdrängungsuntersuchungen an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren in vitro die Wirkung einer Substanz am isolierten Organ vorhergesagt werden kann. Damit kann eine deutliche Reduktion der Anzahl verwendeter Versuchstiere erzielt werden, wenn die Experimente am isolierten Organ durch Bindungsstudien ersetzt werden.

Da die Auffindung von Substanzen mit agonistischen bzw. antagonistischen Eigenschaften am muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor für unsere Forschung nicht von Interesse war, wurde dieses Modell nicht routinemäßig zum Screening eingesetzt.

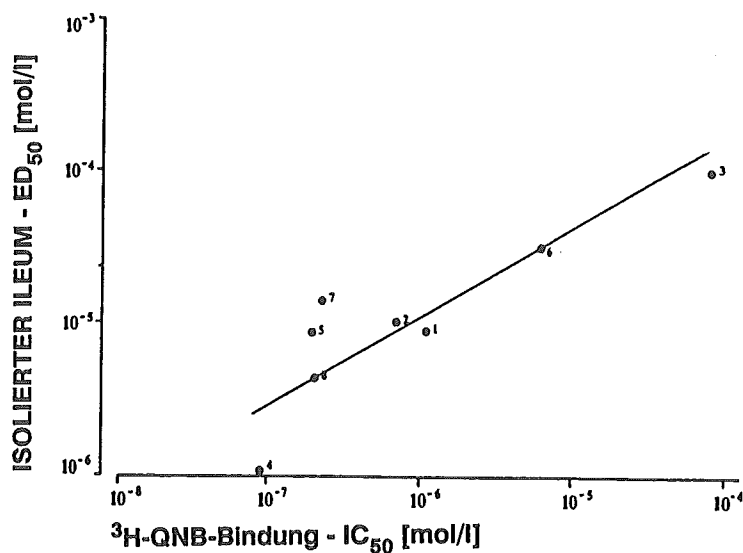


Abb. 3.2: Korrelation der Inhibition der spezifischen  $^3H$ -QNB-Bindung an Rattenhirnhomogenat durch neuroleptische Wirkstoffe einerseits ( $IC_{50}$ -Werte) und dem Einfluß auf die Acetylcholinreaktion am isolierten Ileum von Meerschweinchen andererseits ( $ED_{50}$ -Werte). Der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden betrug  $r = 0,9839$ .

- (1) Chlorpromazin
- (2) Clopipazan
- (3) Haloperidol
- (4) Promethazin
- (5) Chlorprothixen
- (6) Fluphenazin
- (7) Thioridazin
- (8) Sulforidazin

### **3.5 Verdrängung von $^3\text{H}$ -Imipramin von der Imipraminbindungsstelle**

#### **3.5.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Nach Inkubation von Rattenhirnhomogenat mit  $^3\text{H}$ -Imipramin in einem geeigneten Medium wird die nicht gebundene Radioaktivität durch Filtration und Spülen entfernt; das an das Rattenhirn gebundene  $^3\text{H}$ -Imipramin wird szintillationsluminometrisch quantifiziert. Der Anteil der unspezifischen Bindung an der Gesamtbindung wird in Gegenwart von unmarkiertem Imipramin ( $10^{-4}$  mol/l) im Inkubationsmedium bestimmt und subtrahiert.

In Anwesenheit von um die Imipraminbindungsstelle konkurrierenden Substanzen wird weniger Radioaktivität gebunden. Als Maß für die Verdrängungseigenschaften einer Substanz gilt die Konzentration, die 50 % der Radioaktivität von Bindungsstelle verdrängt ( $\text{IC}_{50}$ -Wert).

Verdränger des trizyklischen Antidepressivums Imipramin von seiner Bindungsstelle könnten potentielle antidepressive Wirkung haben.

#### **3.5.2 Material und Methoden**

##### **3.5.2.1 Versuchstiere**

Es werden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 150-200 g verwendet.

##### **3.5.2.2 Prüfsubstanzen**

###### **a) Reinsubstanzen:**

Im Primärscreening wird eine Prüfsubstanz bei 100  $\mu\text{mol/l}$  in vier voneinander unabhängigen Experimenten auf ihre Verdrängungseigenschaften hin untersucht. Falls diese prozentualen Hemmwerte in einem pharmakologisch relevanten Bereich liegen, wird die halbmaximale Hemmkonzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) in vier Einzelexperimenten bestimmt.

###### **b) Extrakte aus Pflanzenzellkulturen:**

Im Primärscreening wird ein Prüfextrakt bei 100  $\mu\text{mol/l}$  (Basis der Konzentrationsangabe ist ein angenommenes mitt-

leres Molekulargewicht der Pflanzeninhaltsstoffe von 400 g/mol) in zwei voneinander unabhängigen Experimenten auf seine Verdrängungseigenschaften hin untersucht. Falls eine prozentuale Hemmung > 60 % ermittelt wird, werden Wiederholungsprüfungen bei 100 und 1 µmol/l durchgeführt .

Als Lösungsvermittler erwiesen sich Ethanol und Methanol (5 % Endkonzentration) als geeignet.

Der Substanzbedarf, ermittelt aus der eingesetzten Substanzkonzentration im Screening (100 µmol/l), dem Verdünnungsfaktor (50 µl ad 1000 µl = 1 : 20) und der Anzahl der Einzeluntersuchungen (3 x 4 = 12), beläuft sich auf 500 µl einer 2 mmol/l Substanzlösung (ca. 1 - 2 mg).

### **3.5.2.3 Reagenzien und Puffer**

#### **a) Reagenzien**

Imipramin	Sigma, I-7379
<sup>3</sup> H-Imipramin (spez. Akt. 51 Ci/mmol)	NEN, NET-710
Trizma Base	Sigma, T-1503
L(+)-Ascorbinsäure	Merck, 127
Natriumchlorid	Merck, 6404
Kaliumchlorid	Merck, 4936
Calciumchlorid	Merck, 2382
Magnesiumchlorid	Merck, 5833
Salzsäure	Riedel de Haen, 30720
Szintillator Biofluor	NEN, NEF-961

#### **b) Puffer:**

0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4  
mit folgenden Zusätzen:  
0,11 mol/l NaCl  
0,005 mol/l KCl

### **3.5.2.4 Präparation von Rattenhirn**

Für die Gehirnpräparationen werden männliche Wistar-Ratten (150 - 200 g) verwendet. Nach Dekapitieren der Ratten wird das Gehirn freipräpariert und ohne Medulla oblongata und Pons entnommen. Die Präparate werden bei - 20 °C eingefroren und innerhalb von zwei Wochen verwendet.

### *3.5.2.5 Gewinnung von Rattenhirnmembranen*

Jeweils ein Präparat (ca. 1,5 g) wird in 20 ml eiskaltem 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4 mit 0,11 mol/l NaCl, 0,005 mol/l KCl homogenisiert (Glashomogenisator mit Teflonpistill). Dieses Homogenat wird 10 min bei 48.000 x g zentrifugiert. Das daraus resultierende Membransediment wird einmal gewaschen, resuspendiert in 20 ml 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4 mit o.a. Zusätzen, 10 min bei 48.000 x g zentrifugiert und anschließend in 150 ml eiskaltem 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4 mit o.a. Zusätzen suspendiert.

### *3.5.2.6 Versuchsdurchführung*

Jeweils 1 ml dieses Membranhomogenats wird für die Verdrängungsexperimente eingesetzt. Als spezifischer Ligand wird <sup>3</sup>H-Imipramin (50 µl; spez. Akt. 51 Ci/mmol; NEN, Dreieich) in einer Endkonzentration im Inkubationsansatz von 0,5 nmol/l verwendet.

Die Bestimmung des Anteils der unspezifischen Bindung an der Gesamtbindung erfolgt in Gegenwart von 50 µl Imipramin in einer Endkonzentration von 100 µmol/l ("Blank").

Die Verdrängungseigenschaften einer Prüfsubstanz werden durch Zugabe von 50 µl Substanzlösung zum Inkubationsansatz in den o.a. Endkonzentrationen bestimmt.

Die Inkubation der Proben erfolgt bei 4 °C auf Eis. Nach 60 min wird die Inkubation durch Filtration der Proben (Whatman, GF/B-Glasfaserfilter) beendet und die Filter mit 5 x 5 ml eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen.

Nach Überführung der Filter in Szintillationsgefäße (Minivials) und Zugabe von 4 ml Szintillator (Biofluor, NEN, Dreieich) wird die gebundene Radioaktivität in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1216, RackBeta II) bestimmt.

### *3.5.2.7 Auswertung*

Die Ermittlung aller Einzeldaten erfolgt durch Dreifachbestimmung.

Die Ermittlung der Einzelwerte erfolgt auf der Basis der cpm- (counts per minute)-Bestimmung und Mittelwertbildung der Dreifachbestimmung. Als spezifische Bindung ist die Differenz zwischen den Meßwerten der Gesamtbindung und der Bindung in Anwesenheit des "Blank" definiert. Die Meßwerte von Prüfs- substanz- en werden um den "Blankmeßwert" korrigiert und bezo- gen auf die spezifische Bindung (100 %) als Prozentwert aus- gerechnet.

Als Hemmwirkung einer Prüfs- substanz wird die Differenz des Prozentwertes der  $^3\text{H}$ -Ligandenbindung in Gegenwart der Prüf- substanz zur spezifischen Bindung angegeben.

$\text{IC}_{50}$ -Werte werden auf der Basis der prozentualen Hemmwerte der Einzelkonzentrationen (0,1, 0,3, 1, 3, 10 und  $30 \times 10^{-x}$  mol/l) mittels einer log-probit Analyse graphisch ermittelt. Aus vier unabhängigen Einzelbestimmungen wird der mittlere  $\text{IC}_{50}$ -Wert ( $\bar{x} \pm s_x$ ) errechnet.

### 3.5.3 Ergebnisse und Diskussion

Als Referenzsubstanzen wurden zunächst acht bekannte Antide- pressiva in diesem Rezeptorassay geprüft (Tab. 3.8).

Tab. 3.8: Affinität einiger Antidepressiva zur Imipraminbin- dungsstelle.

Die Konzentration der verdrängenden Substanz, welche die spezifische Rezeptorbindung um 50 % zu inhibie- ren vermag ( $\text{IC}_{50}$ -Wert), wurde mittels der "log-pro- bit-Analyse" aus 6 verschiedenen Konkurrentkonzent- rationen ermittelt.

Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten.

Inhibitor	$\text{IC}_{50}$ -Werte		
Amitriptylin	0,014	$\pm$	0,002
Amitriptylinoxid	24,0	$\pm$	9,0
Nortriptylin	0,068	$\pm$	0,002
Imipramin	0,015	$\pm$	0,003
Desimipramin	0,12	$\pm$	0,06
Zimedin	0,15	$\pm$	0,03
Nomifensin	3,7	$\pm$	2,1
Mianserin	6,9	$\pm$	0,86



Alle geprüften Referenzsubstanzen zeigten halbmaximale Verdrängung im nano-bis mikro-molaren Konzentrations-Bereich. Die geringste Affinität zur Imipraminbindungsstelle zeigte Amitriptylinoxid, das aber seine antidepressiven Eigenschaften in vivo erst nach Metabolisierung zu Amitriptylin entfalten dürfte.

Die Problematik von potentiell antidepressiv wirksamen Substanzen im Tierexperiment besteht darin, daß Tiere keine der Depression beim Menschen ähnelnde klinische Symptomatik entwickeln. So basieren die klassischen pharmakologischen Modelle auf der sogenannten Katecholamin-Hypothese der Depression, die davon ausgeht, daß für depressive Erkrankungen eine zu geringe Konzentration der Neurotransmitter Noradrenalin und Serotonin im Gehirn verantwortlich ist. Die antidepressive Wirkung von Monoaminoxidase-Hemmern (MAO-Hemmern) sowie der klassischen trizyklischen Antidepressiva (AD) beruht nach dieser Hypothese auf einem verringerten Abbau der Katecholamine durch Hemmung der MAO bzw. durch Erhöhung der Katecholamin-Konzentration im synaptischen Spalt infolge der Hemmung der präsynaptischen Wiederaufnahme dieser Neurotransmitter. Die Hemmung der Wiederaufnahme von Katecholaminen durch AD wird auf die Bindung der AD an die Imipramin-Bindungsstelle zurückgeführt, so daß Bindungsuntersuchungen an der Imipramin-Bindungsstelle Aufschluß über eine mögliche antidepressive Wirkung von Substanzen geben können. Andererseits kann davon ausgegangen werden, daß die Entspeicherung katecholaminerger Neurone bei Tieren eine Wirkung erzeugt, die als Korrelat zur menschlichen Depression aufgefaßt werden kann. Substanzen wie Reserpin bzw. Tetrabenazin führen z.B. zu einer Verarmung des Gehirns an biogenen Aminen. Der durch Reserpin verursachte Abfall der Körpertemperatur bzw. die durch Tetrabenazin verursachte Ptosis und Katalepsie sind durch Substanzen aufhebbar, die entweder den Abbau der Katecholamine hemmen oder deren Verfügbarkeit im synaptischen Spalt erhöhen. Daher eignen sich die Modelle des Reserpin- und des Tetrabenazin-Antagonismus für die Auffindung antidepressiv wirksamer Substanzen.

Um zu prüfen, ob eine Korrelation zwischen in vitro mit den in vivo erzielten Ergebnissen herzustellen ist, wurde eine Reihe verschiedener Antidepressiva auf ihre Affinität zur

Imipramin-Bindungsstelle und ihre Fähigkeit zur Antagonisierung des Reserpin-Effektes hin untersucht. Alle geprüften Substanzen - Imipramin, Desimipramin, Nortriptylin, Amitriptylin, Amitriptylinoxid, Nomifensin, Zimeldin und Mianserin - zeigten eine Antagonisierung des durch Reserpin hervorgerufenen Abfalls der Körpertemperatur, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß (Tab. 3.9). Die trizyklischen Antidepressiva Imipramin, Desimipramin, Nortriptylin, Amitriptylin und Amitriptylinoxid hemmten den Reserpin-Effekt in Dosen ab 3,16 bis 10 mg/kg p.o., die letzten beiden genannten allerdings erst nach mehrtägiger Vorbehandlung. Von den untersuchten Substanzen, die nicht zu den trizyklischen Antidepressiva zählen, hatte nur Nomifensin eine vergleichbare Wirkung. Zimeldin hatte einen deutlich schwächeren Effekt, während Mianserin zumindest nach einmaliger oraler Gabe kaum eine Wirkung zeigte.

Vergleicht man die Effekte dieser Substanzen in vivo mit ihren Affinitäten zur Imipramin-Bindungsstelle, so zeigt sich, daß alle trizyklischen AD mit Ausnahme von Amitriptylinoxid mit hoher Affinität an die Imipramin-Bindungsstelle binden. Die relative Wirkstärke in beiden Modellen läßt sich allerdings weniger gut korrelieren, wobei pharmakokinetisch unterschiedliches Verhalten dafür verantwortlich sein könnte; letzteres trifft besonders für das Amitriptylinoxid zu, für das gezeigt werden konnte, daß es im Gehirn in Amitriptylin überführt wird. Der Vergleich der Ergebnisse des Bindungsexperimentes mit denen der In-vivo-Prüfung zeigt, daß trotz gewisser Einschränkungen die hohe Affinität einer Prüfsubstanz zur Imipramin-Bindungsstelle ein erster Hinweis auf potentielle antidepressive Wirksamkeit ist, so daß die Bindungsuntersuchungen für ein erstes orientierendes Screening verwendet werden können. Bessere auf neueren Erkenntnisse zur Pathobiochemie basierende Prüfmodelle - z.B. Veränderungen der  $\beta$ -Rezeptoren-Dichte im Gehirn nach chronischer Applikation von AD - könnten zu einer besseren Korrelierbarkeit zwischen in vitro und in vivo erhaltenen Ergebnissen beitragen.

Tab. 3.9: Vergleich der Effekte von antidepressiv wirkenden Substanzen auf die Imipraminbindungstelle (halb-maximale Inhibition der  $^3\text{H}$ -Imipraminbindung,  $\text{IC}_{50}$ ) einerseits und auf die Reserpin-induzierte Hypothermie in Mäusen (Erhöhung der Rektaltemperatur - 2 h p.a., in %) anderseits.

Substanz	Imipramin- Verdrängung $\text{IC}_{50}$ [nmol/l]	Reserpin- Antagonismus* [%]
Amitriptylin	14	7,9
Imipramin	15	3,2
Nortriptylin	68	9,9
Desimipramin	120	8,8
Amitriptylinoxid	24000	9,6
Nomifensin	3700	10,0
Mianserin	6900	2,1
Zimeldin	150	3,7

\* Dosis: 10 mg/kg

### **3.6 Bindungsuntersuchungen an Benzodiazepin-Rezeptoren**

#### **3.6.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Die Bindungsuntersuchungen an Benzodiazepin-Rezeptoren werden an Rohhomogenaten des Rattenhirns durchgeführt. Als spezifischer Ligand wird  $^3\text{H}$ -Flunitrazepam eingesetzt. Im Verdrängungsexperiment wird dieser Ligand 30 min bei 4 °C mit dem Membranhomogenat und der jeweiligen Prüfsubstanz inkubiert; nach Filtration der Proben wird die Radioaktivität auf den Filtern bestimmt. Der Anteil der unspezifischen Bindung an der Gesamtbindung wird in Anwesenheit von Diazepam ( $10^{-4}$  mol/l) ermittelt.

Substanzen, die den Liganden  $^3\text{H}$ -Flunitrazepam aus seiner Bindung verdrängen, weisen potentielle Benzodiazepin-ähnliche Wirkungseigenschaften (Anxiolyse, Muskelrelaxation) auf.

#### **3.6.2 Material und Methoden**

##### **3.6.2.1 Versuchstiere**

Es werden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 150–200 g verwendet.

##### **3.6.2.2 Prüfsubstanzen**

###### **a) Reinsubstanzen:**

Im Primärscreening wird eine Prüfsubstanz bei 100  $\mu\text{mol/l}$  in vier voneinander unabhängigen Experimenten auf ihre Verdrängungseigenschaften hin untersucht. Falls diese prozentualen Hemmwerte in einem pharmakologisch relevanten Bereich liegen, wird die halbmaximale Hemmkonzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) in vier Einzelexperimenten bestimmt.

###### **b) Extrakte aus Pflanzenzellkulturen:**

Im Primärscreening wird ein Prüfextrakt bei 100  $\mu\text{mol/l}$  (Basis der Konzentrationsangabe ist ein angenommenes mittleres Molekulargewicht der Pflanzeninhaltsstoffe von 400 g/mol) in zwei voneinander unabhängigen Experimenten auf seine Verdrängungseigenschaften hin untersucht. Falls

eine prozentuale Hemmung > 60 % ermittelt wird, werden Wiederholungsprüfungen bei 100 und 1 µmol/l durchgeführt .

Als Lösungsvermittler erwiesen sich Ethanol und Methanol (5 % Endkonzentration) als geeignet.

Der Substanzbedarf, ermittelt aus der eingesetzten Substanzkonzentration im Screening (100 µmol/l), dem Verdünnungsfaktor (50 µl ad 1000 µl = 1 : 20) und der Anzahl der Einzeluntersuchungen (3 x 4 = 12), beläuft sich auf 500 µl einer 2 mmol/l Substanzlösung (ca. 1 - 2 mg).

### **3.6.2.3 Reagenzien und Puffer**

#### **a) Reagenzien:**

Diazepam	Hoffmann La Roche
<sup>3</sup> H-Flunitrazepam (spez. Akt. 82 Ci/mmol)	NEN, NET-567
Trizma Base	Sigma, T-1503
Salzsäure	Riedel de Haen, 30720
Szintillator Biofluor	NEN, NEF-961

#### **b) Puffer:**

0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4

### **3.6.2.4 Präparation von Rattenhirn**

Für die Gehirnpräparationen werden männliche Wistar-Ratten verwendet. Nach Dekapitieren der Ratten wird das Gehirn freipräpariert und ohne Medulla oblongata und Pons entnommen. Die Präparate werden bei - 20 °C eingefroren und innerhalb von zwei Wochen verwendet.

### **3.6.2.5 Gewinnung von Rattenhirnmembranen**

Jeweils ein Präparat (ca. 1,5 g) wird in 20 ml eiskaltem 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4 homogenisiert (Glas-homogenisator mit Teflonpistill). Dieses Homogenat wird 10 min bei 48.000 x g zentrifugiert. Das daraus resultierende Membransediment wird in 100 ml eiskaltem 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 7,4 suspendiert.

#### 3.6.2.6 Versuchsdurchführung

Jeweils 1 ml dieses Membranhomogenats wird für die Verdrängungsexperimente eingesetzt. Als spezifischer Ligand wird  $^3\text{H}$ -Flunitrazepam (50  $\mu\text{l}$ ; spez. Akt. 82 Ci/mmol; NEN, Dreieich) in einer Endkonzentration im Inkubationsansatz von 0,85 nmol/l verwendet.

Die Bestimmung des Anteils der unspezifischen Bindung an der Gesamtbindung erfolgt in Gegenwart von 50  $\mu\text{l}$  Diazepam in einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  ("Blank").

Die Verdrängungseigenschaften einer Prüfsubstanz werden durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  zum Inkubationsansatz in den o.a. Endkonzentrationen bestimmt.

Die Inkubation der Proben erfolgt bei 4 °C auf Eis. Nach 30 min wird die Inkubation durch Filtration der Proben (Whatman, GF/B-Glasfaserfilter) beendet, und die Filter werden mit 3 x 3 ml eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen.

Nach Überführung der Filter in Szintillationsgefäße (Minivials) und Zugabe von 4 ml Szintillator (Biofluor, NEN, Dreieich) wird die gebundene Radioaktivität in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1216, RackBeta II) bestimmt.

#### 3.6.2.7 Auswertung

Die Ermittlung aller Einzeldaten erfolgt durch Dreifachbestimmung.

Die Ermittlung der Einzelwerte erfolgt auf der Basis der cpm- (counts per minute)-Bestimmung und Mittelwertbildung der Dreifachbestimmung. Als spezifische Bindung ist die Differenz zwischen den Meßwerten der Gesamtbindung und der Bindung in Anwesenheit des "Blank" definiert. Die Meßwerte von Prüfsubstanzen werden um den "Blankmeßwert" korrigiert und bezogen auf die spezifische Bindung (100 %) als Prozentwert ausgerechnet.

Als Hemmwirkung einer Prüfsubstanz wird die Differenz des Prozentwertes der  $^3\text{H}$ -Ligandenbindung in Gegenwart der Prüfsubstanz zur spezifischen Bindung angegeben.

IC<sub>50</sub>-Werte werden auf der Basis der prozentualen Hemmwerte der Einzelkonzentrationen (0,1, 0,3, 1, 3, 10 und 30 x 10<sup>-x</sup> mol/l) mittels einer log-probit Analyse graphisch ermittelt. Aus vier unabhängigen Einzelbestimmungen wird der mittlere IC<sub>50</sub>-Wert ( $\bar{x} \pm s_x$ ) errechnet.

### 3.6.3 Ergebnisse und Diskussion

Dieses Modell wurde schon vor Beginn des Projekts einige Jahre routinemäßig im Rahmen des BMFT-Projektes PTB 8202/BLT 327 (siehe Zwischenberichte vom 1.7.-31.12.1981 und vom 1.1.-30.6.1982) für die Prüfung von Extrakten aus Pflanzenzellkulturen eingesetzt.

So konzentrierten sich die Experimente im Berichtszeitraum darauf, verschiedene Benzodiazepin-Derivate als Referenzsubstanzen in vitro im Bindungsexperiment zu untersuchen und die gewonnenen Daten mit in vivo erzielten Ergebnissen zu vergleichen.

Die Konzentrationen der Referenzsubstanzen, die eine halbmaximale Verdrängung ergaben (IC<sub>50</sub>-Werte), sind in Tabelle 3.10 zusammengefaßt. Für die geprüften Referenzsubstanzen liegen die halbmaximalen Hemmkonzentrationen im nano- bis mikromolaren Bereich, wobei sich entsprechend der Wirkstärke folgende Reihenfolge ergibt: Chlordesmethyldiazepam > Lorazepam > Flunazepam > Diazepam > Nitrazepam > Oxazepam > Chlordiazepoxid > Medazepam.

Neben den anxiolytischen und muskelrelaxierenden Eigenschaften der Benzodiazepine wird auch die antikonvulsive Wirkung dieser Substanzgruppe therapeutisch genutzt. Diese läßt sich in mehreren Versuchsanordnungen in vivo gut demonstrieren. Eines der Standard-Tiermodelle für diese Wirkqualität ist das Modell "Maximaler Elektroschock an der Maus" (De Angelis, 1979). Das Prinzip dieses Testverfahrens besteht darin, dem Tier über Ohrelektroden einen Elektroschock zu versetzen, der Extensorenkrämpfe auszulösen vermag. Antikonvulsiv wirksame Substanzen verhindern dosisabhängig das Auftreten dieser Krämpfe, wobei dieser Effekt in Dosierungen deutlich wird, die auch bereits die Motilität der Tiere beeinträchtigen. Obwohl für einige Benzodiazepin-Derivate wie Clonazepam, Bro-

mazepam und Nitrazepam bekannt ist, daß sie relativ stärker antikonvulsiv als anxiolytisch und muskelrelaxierend wirksam sind, eignet sich dieses Modell zu Auffindung von Benzodiazepinen und anderen über den gleichen Mechanismus wirkenden Substanzen.

Alle untersuchten Benzodiazepine hemmten nach oraler Applikation dosisabhängig das Auftreten der Extensorenkrämpfe der Maus nach Elektroschock. Ordnet man die geprüften Substanzen nach den  $ID_{50}$ -Werten (halbmaximale inhibitorische Dosis), so lassen sie sich in drei Gruppen aufteilen: die relativ stark wirksamen Benzodiazepine Diazepam, Lorazepam, Chlordesmethyldiazepam und Oxazepam mit  $ID_{50}$ -Werten unter 10,0 mg/kg p.o.; die mittelstark wirksamen Benzodiazepine Nitrazepam und Flurazepam (10,0 mg/kg;  $ID_{50} < 30$  mg/kg) und die schwach wirksamen Benzodiazepine Clonazepam, Chlordiazepam und Medazepam ( $ID_{50} > 75,0$  mg/kg).

Korreliert man die Verdrängungseigenschaften von Benzodiazepinen im Rezeptorbindungsexperiment ( $IC_{50}$ -Werte) mit den im pharmakologischen Experiment erzielten Ergebnissen ( $ID_{50}$ -Werte), so ergibt sich eine gute Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,965$ .

Für die Benzodiazepine konnte also deutlich gemacht werden, daß das Rezeptorbindungsexperiment als geeigneter Ersatz für entsprechende In-vivo-Testmodelle herangezogen werden kann.



Tab. 3.10: Affinität von Benzodiazepinen zum Benzodiazepinrezeptor

Die Konzentration der verdrängenden Substanz, welche die spezifische Rezeptorbindung um 50 % zu inhibieren vermag ( $IC_{50}$ -Wert), wurde mittels der "log-probit-Analyse" aus 6-8 verschiedenen Konkurrentkonzentrationen ermittelt.

Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten.

Inhibitor	$IC_{50}$ -Wert [nmol/l]	
Chlordesmethyldiazepam	6,9 $\pm$	0,9
Lorazepam	9,1 $\pm$	1,4
Flurazepam	11	
Diazepam	19 $\pm$	2,0
Nitrazepam	31 $\pm$	5,0
Oxazepam	43 $\pm$	2,0
Chlordizepoxid	1200 $\pm$	400
Medazepam	4400 $\pm$	400

### **3.7 Rezeptorassay für Atriale Natriuretische Peptide (ANP)**

#### **3.7.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Nach Inkubation eines "monolayer" von Kaninchen-Aortenzellen mit  $^{125}\text{J}$ -ANP in einem geeigneten Medium bei 4 °C wird die nicht gebundenen Radioaktivität durch Spülen entfernt; die an die Zellen gebundenen  $^{125}\text{J}$ -ANP werden nach Auflösen der Zellen in Natronlauge szintillationsluminometrisch quantifiziert. Der Anteil der unspezifischen Bindung der Gesamtbindung wird in Gegenwart eines 1000fachen Überschusses an unmarkierten ANP im Inkubationsmedium bestimmt und substrahiert.

In Anwesenheit von um den ANP-Rezeptor konkurrierenden Substanzen wird weniger Radioaktivität gefunden. Als Maß für die Verdrängungseigenschaften einer Substanz gilt die Konzentration, die 50 % der Radioaktivität von der Bindungsstelle verdrängt ( $\text{IC}_{50}$ -Wert).

ANP-Rezeptor-Agonisten könnten wertvolle Therapeutika für die Behandlung des Bluthochdrucks und der Herzinsuffizienz sein. Der Kompetitionstest erlaubt nicht die Differenzierung von Rezeptor-Antagonisten und -Agonisten; daher wird er ergänzt durch die Bestimmung von intrazellulärem zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP), da die Bindung von ANP an ANP-Rezeptoren zu einer Aktivierung der membranständigen Guanylatzyklase führt.

#### **3.7.2 Material und Methoden**

##### **3.7.2.1 Kaninchenaortenzellen**

Für die ANP-Kompetitionsuntersuchungen bzw. Aktivitätsbestimmungen der membrangebundenen Guanylatzyklase wird eine Kaninchenaorten-Primärkultur eingesetzt. Zur Präparation wird ein ca. 5 cm langes Aortensegment aus dem thorakalen Bereich frisch entnommen und die Blutreste durch intensives Waschen in PBS-Puffer (s. 3.7.2.2) entfernt. Adipöses Gewebe wird mittels sterilen Skalpells entfernt und die Aorta nach erneutem Waschen in PBS mittels einer heißsterilisierten Schere (2 h, 180 °C) in ca. 5 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und 24

Stunden mit DMEM/10 % FKS/Dispase I (1 U/ml, Boehringer Mannheim, Nr. 210455) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Medium wird anschliessend bei 2.000 Upm abzentrifugiert (Labofuge 6000), das verbleibende Pellet einmal mit DMEM gewaschen und nach Zugabe von DMEM/10 % FKS erneut im Brutschrank 24 h inkubiert. Die nicht von der Dispase abgebauten Gewebsreste werden anschliessend abgesaugt und die adhärenen Kaninchenaortenzellen bis zur Konfluenz kultiviert.

Die von uns verwendeten Zellen sind seit 1986 in der 5. Passage in Kulturmedium unter Zusatz von 10 %ig DMSO bei -196 °C kryokonserviert und wurden zwischen der 8. und 15. Passage für die Versuche eingesetzt.

### **3.7.2.2 Kulturmedium und Puffer**

#### **a) Kulturmedium, Medienadditiva und Antibiotika:**

1. Minimum Essential Medium, nach Dulbecco (DMEM, Boehringer Mannheim Nr. 210048)
2. Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ , Merck Nr. 6323)
3. Streptomycinsulfat (Serva, Nr. 35500)
4. Penicillin G-Kaliumsalz (Serva, Nr. 31749)
5. Fötale Kälberserum (FKS, Seromed, verschiedene Chargen)
6. Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA, 100fach konzentriert, Boehringer Mannheim, Nr. 210293)
7. Rinderserumalbumin (BSA, Sigma A7906)

DMEM-Pulverkonzentrat (für 5 l Medium)

- + 18,5 g  $\text{NaHCO}_3$
- + 0,5 g Streptomycinsulfat
- + 0,3 g Penicillin G (500.000 IU)

werden mit bidest. Wasser auf 5 l aufgefüllt und nach 15-30minütigem Rühren sterilfiltriert (Filter 0,2  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schüll, Nr. 401352).

Die NEAA werden vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Das FKS wird vor Gebrauch 10 %ig (v/v) dem Flüssigmedium zugesetzt.

BSA wird als sterile 10 %ige Stammlösung in bidest. Wasser bei 4 °C gelagert und dem Flüssigmedium vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Als DMEM-Medium wird grundsätzlich das Nährmedium ein-

schließlich  $\text{NaHCO}_3$ , NEAA und Antibiotika bezeichnet. Alle anderen Zusätze (FKS, BSA) werden gesondert aufgeführt.

*b) Zusammensetzung des PBS-Puffers:*

Zum Waschen der Zellen wird "phosphate buffered saline (PBS) verwendet:

- 8,0 g  $\text{NaCl}$  (Merck, Nr. 6404)
- 0,2 g  $\text{KCl}$  (Merck, Nr. 4936)
- 1,15g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma, Nr. S0876)
- 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Nr. 4873)

werden mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt - der pH-Wert der Lösung beträgt 7,0.

*3.7.2.3 Trypsinlösung*

100 ml 0,25 %ige Trypsinlösung (Flow, Nr. 1689454) werden mit 7 ml einer 1 %igen EDTA-Lösung (in sterilem PBS-Puffer) versetzt.

*3.7.2.4 Subkultivierung der Aortenzellen*

Alle im folgenden beschriebenen Arbeitsgänge erfolgen unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank, sterile Verbrauchsware, Pipetten):

1. Medium absaugen
2. 2 ml Trypsinlösung zusetzen (bei NUNC-Petrischalen, d = 10 cm, Nr. 150350)
3. Nach 5 min bei 37 °C die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen pipettieren, in dem 2 ml DMEM/10 % FKS vorgelegt wurden
4. Zentrifugation bei 2.000 Upm (Labofuge 6000, Heraeus), 1 min
5. Absaugen des Überstandes, suspendieren des Zellpellets in 5 ml DMEM/10 % FKS
6. Zentrifugation wie 4.
7. Überstand absaugen, Zellpellet in 5 ml DMEM/10 % FKS aufnehmen und auf fünf neue Petrischalen verteilen, in denen 10 ml DMEM/10 % FKS vorgelegt wurden.

### 3.7.2.5 Einfrieren von Aortenzellen

Punkt 1.-6. wie unter 3.7.2.4 beschrieben

7. Pellet suspendieren in 1 ml DMEM/10 % FKS/10 % DMSO und in eine Ampulle (NUNC, Nr. 363401) pipettieren
8. Mit Einfrierstopfen (Union Carbide) auf Position "G" 2 h im Stickstoffbehälter belassen, danach alle 15 min eine Position tiefer setzen.

### 3.7.2.6 Proteinbestimmung nach Lowry

Lösungen:

- |            |   |
|------------|---|
| Reagenz A: | 2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3$<br>0,1 mol/l NaOH  |
| Reagenz B: | 1 % Kalium-Natrium-Tartrat<br>0,5 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$<br>einzeln lösen, dann zusammengeben |
| Reagenz C: | 50 Teile Reagenz A<br>+ 1 Teil Reagenz B  |

Prüflösung:

- 100  $\mu\text{l}$  Probe mit 2 ml Reagenz C gut mischen und 10 min stehen lassen.
- 100  $\mu\text{l}$  Folin-Reagenz (Fa. Merck, Nr. 9001) zugeben, gut mischen und 30 min stehen lassen
- 100  $\mu\text{l}$  Triton-X-100 (1%ig in dest. Wasser) zugeben.
- Absorptionsbestimmung gegen Reagenz + Folin + Triton als Leerwert im Spektralphotometer (Beckman, Modell 34) - Wellenlänge: 660 nm

Eichlösung:

- 0,1 % BSA-Lsg.
- 10-50  $\mu\text{l}$  = 10 - 50  $\mu\text{g}$  BSA/Ansatz

### 3.7.2.7 Durchführung der ANP-Bindungsstudien

#### a) Vorbereitung

Da die ANP-Bindungscharakteristik wesentlich von der Zelldichte im Petrischalensystem abhängig ist, müssen folgende Subkultivierungsmodalitäten unbedingt eingehalten werden:

- (1) Die Kaninchenaortenzellen sollten erst ab der 3. (relativ!) Passage nach dem Auftauen einer Ampulle für das

ANP-Rezeptorscreening eingesetzt werden, da erst dann ein konfluenter Monolayer Synthese-aktiver Zellen zu realisieren ist.

(2) Die Zellen sollten nicht mehr als 10 Passagen ununterbrochen in Kultur sein, um die Vergleichbarkeit der Screeningergebnisse zu gewährleisten.

*b) Durchführung der ANP-Bindungen und Versuchsaufarbeitung*

Die Zellen werden in Multischalen mit 24 Vertiefungen angezüchtet (DMEM/10 % FKS), nach 48 h mit PBS gewaschen und 18 h mit DMEM/0,1 % BSA im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Zellen werden anschliessend einmal mit eiskaltem PBS/0,1 % BSA-Puffer gewaschen und im Eisbad mit 0,25 ml eisgekühltem DMEM, welches je nach Experiment 10 - 1000 fmol/ml <sup>125</sup>J-ANP (DuPont, Nr. NEX228, spezifische Aktivität 2200 Ci/mmol) für 30 min inkubiert. Bei Konkurrenzexperimenten werden nicht markierte ANP (Sigma, A1663) bzw. die Prüfsubstanzen in 0,25 ml eiskaltem DMEM/0,1 % BSA vorgelegt und die Radiotracerlösung (100 fmol/ml <sup>125</sup>J-ANP in DMEM) zupipettiert. Die Prüfsubstanzen werden dabei in Ethanol vorgelöst und mit DMEM auf die gewünschte Endkonzentration (meist 10<sup>6</sup> mol/l, unter Berücksichtigung der Volumenverdopplung durch die Radiotracerlösung) eingestellt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung werden Inkubationen in Gegenwart des jeweils 1000fachen Überschusses nicht-markierter ANP durchgeführt.

Der Monolayer wird anschliessend einmal mit PBS/ 0,1 % BSA-Puffer und dreimal mit PBS-Puffer ohne Zusatz gewaschen. Beide Puffer sind eisgekühlt, um eine vermehrte Degradation der gebundenen ANP zu verhindern.

Die Zellen werden durch Zugabe von 500 µl 0,5 mol/l NaOH-Lösung/MS-Vertiefung solubilisiert und die gebundene ANP-Radioaktivität im Gammacounter (LKB, Rackgamma II Modell 1270) quantifiziert. Ein 100 µl-Aliquot wird zur Zellproteinbestimmung nach Lowry (s. 3.7.2.6) eingesetzt.

### *c) Auswertung der Kompetitionsstudien*

Bestimmt wird die Masse spezifisch gebundener  $^{125}\text{J}$ -ANP durch Subtraktion der in Gegenwart der 1000fach überschüssigen gebundenen Radioligandenmenge von der Gesamtbindungs-  
menge bei den Kontroll- bzw. Substanzinkubationen. Die Radioaktivitätsdaten werden dabei immer auf das Zell- bzw. Homogenatprotein bezogen, wobei aus drei Inkubationsansätzen pro Substanz bzw. Konzentration der Mittelwert ermittelt wird. Die substanzbedingte Verdrängung des radiojodierten ANP vom Rezeptor wird als Differenz zur Kontrollinkubation prozentual ausgedrückt.

### *3.7.2.8 Untersuchungen zur ANP-Rezeptor-Agonisten-/Antagonisten-Differenzierung*

Die Zellen werden in 10-cm-Petrischalen nach 3.7.2.4 angezüchtet (DMEM/10 % FKS), nach 48 h mit PBS gewaschen, mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Isobutylmethylxanthin (vorgelöst in Ethanol, 1 %ige Ethanolendkonzentration) in DMEM/0,1 % BSA versetzt und 10 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach Zusatz von ANP (als Referenzsubstanz, Sigma, Nr. A1663) bzw. den Prüfsubstanzen (vorgelöst in Ethanol, 1 %ige Ethanolendkonzentration) wird weitere 30 min bei 37 °C (Brutschrank) inkubiert. Das Medium wird anschliessend abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, nach Abschaben mittels Gummiwischer mit 2 ml PBS-Puffer in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C zentrifugiert (800 x g, J2-21 Kühlzentrifuge). Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml 6 %iger Trichloressigsäurelösung aufgenommen und 30 sec bei 40 W ultrabeschallt (Branson-Sonifier B12). Anschliessend wird 15 min bei 2.500 x g zentrifugiert (4 °C, J2-21 Kühlzentrifuge), der Überstand viermal mit wassergesättigtem Ether extrahiert und die wässrige Phase bei 70 - 80 °C (Wasserbad) unter Stickstoffgasstrom abgeblasen. Der Rückstand wird in 150  $\mu\text{l}$  0,05 mol/l Natriumacetatpuffer (pH 6,2) aufgenommen; 100  $\mu\text{l}$  werden für die cGMP-Bestimmung mittels Radioimmunoassay (s. 3.7.2.9) eingesetzt.

### 3.7.2.9 Bestimmung des intrazellulären cGMP

Es wird ein kommerziell erhältlicher Radioimmunoassay (RIA)-Kit (DuPont, Nr. NEX133) eingesetzt:

a) Im RIA-Kit enthaltene Reagenzien:

1. Natriumacetatpuffer (0,05 mol/l, pH 6,2) :  
wird mit 500 ml bidest. Wasser aufgefüllt und bei 2-8 °C gelagert
2. cGMP-Standard:  
wird mit 20 ml bidest. Wasser aufgefüllt - Konzentration: 2 nmol cGMP/ml
3. cGMP-Antiserumkomplex:  
wird mit 21 ml bidest. Wasser aufgefüllt
4. cGMP-Tyrosine-Methylester [<sup>125</sup>J]:  
27,8 kBq cGMP [<sup>125</sup>J], gelöst in 1 ml n-Propanol/Wasser = 1:1 (v/v), werden mit 5 ml bidest. Wasser gemischt
5. Kaninchenserum:  
wird in 5 ml bidest. Wasser gelöst und mit der Lösung aus 4. gemischt - die resultierende Lösung wird im folgenden als "Tracerlösung" bezeichnet
6. Essigsäureanhydrid
7. Triethylamin
8. Acetylierungsreagenz:  
Ein Teil Essigsäureanhydrid mit zwei Teilen Triethylamin kurz vor Gebrauch mischen.

Zusätzlich wird eine zu 70 % gesättigte Ammoniumsulfatlösung benötigt (47,2 g Ammoniumsulfat in 100 ml bidest. Wasser).

b) Durchführung der cGMP-Bestimmungen:

Zur Erstellung der Standardkurve wird Lösung 2 mit Natriumacetatpuffer (Lösung 1) 1:20 verdünnt. Die sich ergebene Stammlösung (100 pmol/ml cGMP) wird in folgender Tabelle mit "S" bezeichnet:



*Verdünnungsreihe zur Standardkurvenerstellung:*

Konzentration [fmol/100 µl]	cGMP-Lösg.	Natriumacetat -Puffer	ergibt Standard
500	0,1 ml S	1,9 ml	A
250	1,0 ml A	1,0 ml	B
100	1,0 ml B	1,5 ml	C
50	1,0 ml C	1,0 ml	D
25	1,0 ml D	1,0 ml	E
10	1,0 ml E	1,5 ml	F
5	1,0 ml F	1,0 ml	G
2,5	1,0 ml G	1,0 ml	H

*Die cGMP-Bestimmung wird nach folgendem Schema durchgeführt:*

Probenbezeich- nung Nr.	Natriumacetat Puffer [µl]	Acetylierungs- reagenz [µl]	Tracer [µl]	Anti- serum [µl]
1-3 "Blank"	200		100	
4-6 "B0"	100	5	100	100
7-9 "Total Counts"			100	
10-12 Standard H		5	100	100
13-15 Standard G		5	100	100
16-18 Standard F		5	100	100
19-21 Standard E		5	100	100
22-24 Standard D		5	100	100
25-27 Standard C		5	100	100
28-30 Standard B		5	100	100
31-33 Standard A		5	100	100
34-36 Probe 1		5	100	100
37 ... weitere Pr.				

Die Proben werden in Vorlaufgefäßen (Greiner, Nr. 697101) unter Schütteln mit 5 µl Acetylierungsreagenz versetzt, 100 µl Tracerlösung zupipettiert und nach Zusatz des Antiserums (Lösung 3) erneut kräftig geschüttelt. Nach einer 18stündigen Inkubation bei 4 °C wird unter Zusatz von 1 ml eiskalter 70%ig gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt, unter Kühlung 15 min bei 2.500 x g zentrifugiert (4 °C, J2-21 Kühlzentrifuge) und nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes die Radioaktivität des Pellets im Gammazähler (LKB 1270, Rackgamma II) quantifiziert. Mit Hilfe der im Zähler implementierten Software wird aus der Standardkurve der cGMP-Gehalt der Proben automatisch in fmol cGMP pro 100 µl ermittelt, so daß nur eventuelle Probenverdünnungen bei der Berechnung zu berücksichtigen sind.

### 3.7.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Inkubation der Kaninchen-Aorten-Zellen in Gegenwart von  $^{125}\text{J}$ -ANP führt zu einer zeitabhängigen Bindung des Liganden, wobei nach etwa 30 min eine maximale Bindung erreicht wird (Abb. 3.3). Dabei darf eine Temperatur von 4 °C nicht überschritten werden, um eine Aufnahme und Degradation des Liganden zu vermeiden. Bei 4 °C kommt es erst nach einer Inkubationsdauer von 60-120 min zu einem steilen Anstieg der zellgebundenen Radioaktivität, die auf die Internalisation von  $^{125}\text{J}$ -ANP zurückzuführen ist.

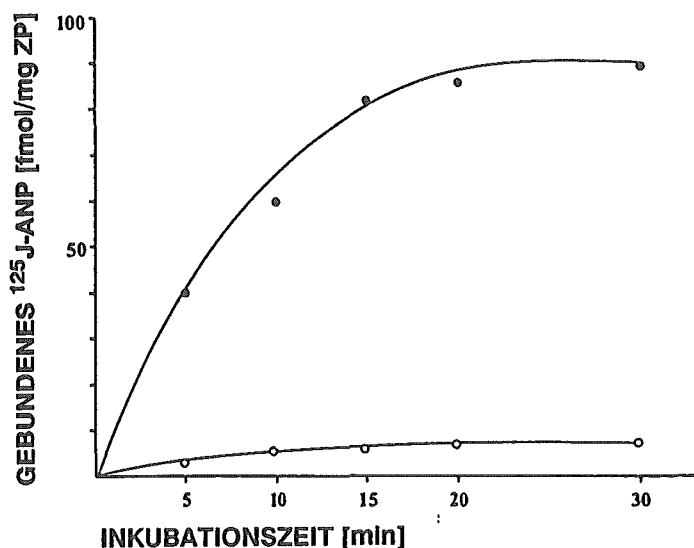


Abb. 3.3: Kinetiken der spezifischen ( ● ) und der unspezifischen ( ○ ) Bindung von  $^{125}\text{J}$ -ANP an Aortenzellen. Kaninchenaortenzellen (10. Passage) wurden in DMEM/0,1 % BSA (= Bindungspuffer) über Nacht im Brutschrank bei 37 °C vorinkubiert. Vor der Bindung wurden die Zellmonolayer mit eiskaltem Bindungspuffer gewaschen und anschliessend mit 40 fmol/ml  $^{125}\text{J}$ -ANP (NEN, spez. Akt. 4500 cpm/fmol) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden parallel Inkubationen in Gegenwart des 1000fachen Überschusses nicht-radioaktiver ANP durchgeführt. Nach der Bindungsinkubation wurden die Monolayer 4fach mit eiskaltem PBS-Puffer, pH 7,4, gewaschen und mit 1 ml NaOH, c = 0,5 mol/l solubilisiert. 500 µl der Lösung wurden zur Radioaktivitätsbestimmung im Gammazähler (LKB, Modell 1270) eingesetzt; 100 µl dienten der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951). Angegeben sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen.

Eine Vorinkubation der Zellen über Nacht mit 0,1 % BSA führt zu besser reproduzierbaren Ergebnissen; auch werden nur konfluente "Monolayer" verwendet, um eine Bindung des Tracers an die oberflächenaktivierte Petrischale zu vermeiden oder wenigstens zu verringern.

In Gegenwart eines Überschusses von unmarkiertem ANP wird der radioaktiv markierte Ligand in Abhängigkeit von der Konzentration des "Displacers" aus der Bindung verdrängt (Abb. 3.4).

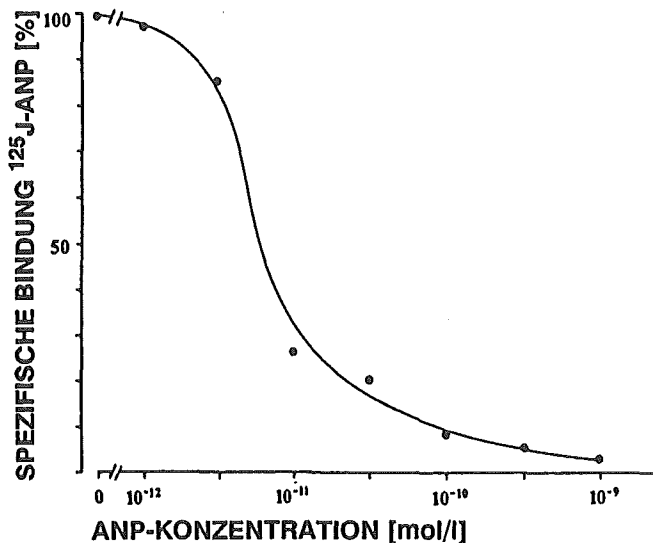


Abb. 3.4: Bindung von ANP an kultivierte Kaninchenaortenzellen.

Kaninchenaortenzellen (8-10. Passage) wurden in DMEM/ 0,1 % BSA (= Bindungspuffer) über Nacht im Brutschrank bei 37 °C vorinkubiert. Vor der Bindung wurden die Zellmonolayer mit eiskaltem Bindungspuffer gewaschen und anschließend mit 100 fmol/ml <sup>125</sup>J-ANP (NEN, spez. Akt. 2200 cpm/fmol) bei 4 °C 0,5 h in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen an nicht markierten ANP inkubiert. Die weiteren Aufarbeitungsschritte erfolgten, wie in der Legende zur Abb. 3.3 beschrieben. Angegeben sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen.

Die Abhängigkeit der <sup>125</sup>J-ANP-Bindung von der ANP-Konzentration ist in Abb. 3.5 graphisch dargestellt.

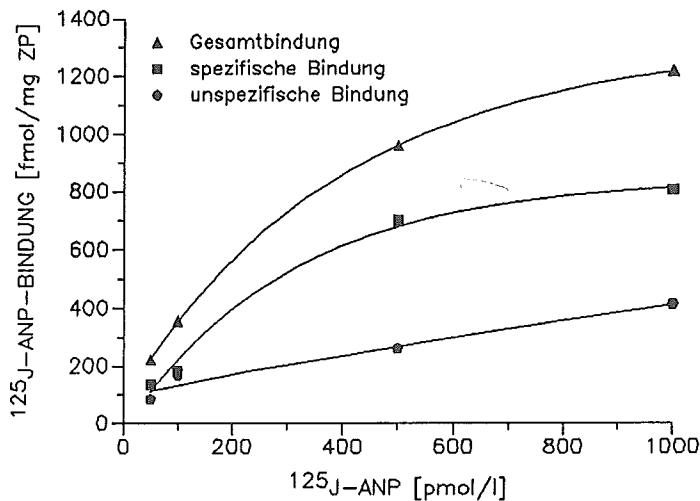


Abb. 3.5: Konzentrationsabhängige Bindung von  $^{125}\text{J-ANP}$  an Aortenzellen.

Kaninchenaortenzellen (10. Passage) wurden in DMEM/0,1 % BSA (= Bindungspuffer) über Nacht im Brutschrank bei 37 °C vorinkubiert. Vor der Bindung wurden die Zellmonolayer mit eiskaltem Bindungspuffer gewaschen und anschliessend mit den angegebenen Konzentrationen  $^{125}\text{J-ANP}$  (NEN, spez. Akt. 25 cpm/fmol) für 30 Min. inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden parallel Inkubationen in Gegenwart des 1000fachen Überschusses nichtradioaktiver ANP durchgeführt.

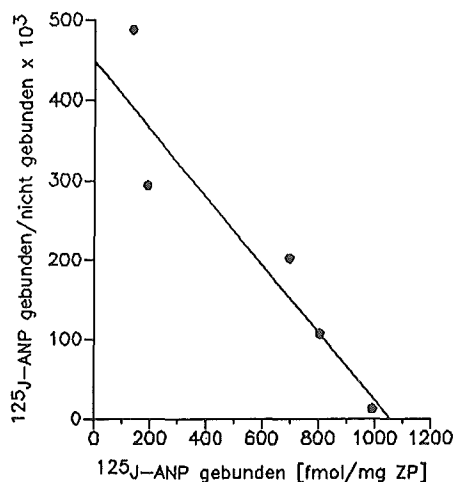
Nach der Bindungssinkubation wurden die Monolayer 4fach mit eiskaltem PBS-Puffer, pH 7,4, gewaschen und mit 1 ml NaOH,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$  solubilisiert. 500  $\mu\text{l}$  der Lösung wurden zur Radioaktivitätsbestimmung im Gammazähler (LKB, Modell 1270) eingesetzt - 100  $\mu\text{l}$  dienten der Proteinbestimmung nach Lowry et al., 1951.

Angegeben sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen.

Das Plateau der spezifischen bzw. Gesamtbindung ab ca. 500 pmol/l  $^{125}\text{J-ANP}$  zeigt eine Sättigung der Rezeptoren an. Eine weitere Erhöhung der ANP-Stoffmenge im Inkubationsmedium führt zwar zur Erhöhung der Gesamt-Bindung, jedoch nur aufgrund der stark ansteigenden unspezifischen Bindung von  $^{125}\text{J-ANP}$  in Gegenwart des 1000fachen Überschusses an unmarkiertem ANP (Daten nicht aufgeführt).

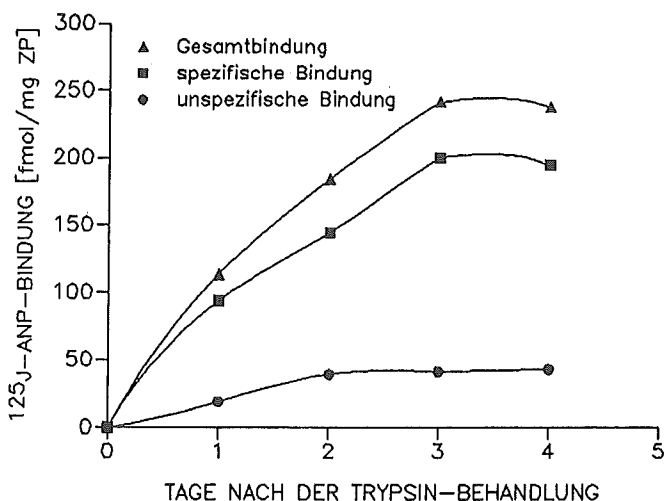
Die Auswertung nach Scatchard (Abb. 3.6) erbringt eine Bindungskonstante ( $K_D$ ) von 270 pmol/l bei ca. 200.000 Rezeptoren

pro Zelle. Diese Daten stimmen sehr gut mit den von Schenk et al. (1985) gefundenen Daten für Rinderendothelzellen ( $K_D = 300 \text{ pmol/l}$ ; ca. 210.000 Rezeptoren/Zelle) überein.



*Abb. 3.6: Scatchardanalyse der spezifischen Bindungsdaten aus Abb. 3.5  
Angegeben sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen.*

Waldman et al. (1984) konnte den inhibierenden Effekt von Trypsin auf die cGMP-Bildung in Rattennierenmembranen nachweisen. Da diese Protease zur Subkultivierung der Aortenzellen verwendet wird, wurde der Trypsin-Einfluß auf die ANP-Bindung genauer untersucht. Abbildung 3.7 zeigt, daß erst 3 Tage nach der letzten Subkultivierung der Zellen eine maximale Bindung der ANP-Moleküle erreicht wird.



**Abb. 3.7:** Einfluß der Subkultivierung auf die  $^{125}\text{J}$ -ANP-Bindung  
 Kaninchenaortenzellen (10. Passage) wurde mittels 0,05 % Trypsin (Flow-Laboratories)/ 0,05 % EDTA gesplittet und für die angegebenen Zeiten kultiviert. Nach einer Vorinkubation mit DMEM/ 0,1 % BSA bei 37 °C im  $\text{CO}_2$ -begasteten Brutschrank über Nacht, wurden die Bindungen mit 40 pmol  $^{125}\text{J}$ -ANP/ml für 30 Min. bei 4 °C durchgeführt. Die Zelldichte am Tag der Bindung war auf allen Petrischalen gleich, was durch eine Proteinbestimmung nach Lowry et al., 1951, ermittelt wurde. Alle weiteren Aufarbeitungsschritte wurde wie in der Legende zur Abb. 3.5 beschrieben durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen.

Der proteolytische Einfluß auf die Anzahl funktionsfähiger Rezeptoren muß also beim Substanzscreening berücksichtigt werden, um eine Vergleichbarkeit mehrerer Testreihen gewährleisten zu können.

Für das Screenen von Substanzen ist eine Auswahl von Lösungsvermittlern bzw. Lösungsmitteln von entscheidender Bedeutung. Es wurde daher der Einfluß verschiedener, mit Wasser mischbarer Lösungsmittel auf die ANP-Bindung bestimmt. (Tab. 3.11). Es konnte gezeigt werden, daß Ethanol, Aceton und DMSO bis zu einer Endkonzentration von 1 Vol% zum Screening einsetzbar sind, während Dioxan bei dieser Konzentration die ANP-Bindung bereits erheblich beeinflusst, was unter anderem mit der Lipophilie dieses organischen Lösungsmittels und mit der damit

einhergehenden Zerstörung der Zellmembranstruktur erklärt werden kann.

Unter Einbeziehung dieser Erkenntnisse wurden ca. 130 Reinsubstanzen aus unserer Pflanzenzellkultur (PZK) auf ihre ANP-kompetitorische Potenz untersucht. Die in Tabelle 3.12 dargelegten Ergebnisse zeigen, daß nur einige wenige Substanzen Verdrängungseigenschaften aufwiesen, die allerdings als sehr gering zu bewerten sind.

*Tab. 3.11: Einfluß verschiedener Lösungsmittel auf die Bindung von  $^{125}\text{J}$ -ANP.*  
*Vorinkubationsschritte wurden wie in der Legende zur Abb. 3.5 beschrieben durchgeführt.*  
*Die Bindungsexperimente wurden in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen Ethanol, Aceton, Dimethylsulfoxid (DMSO) bzw. Dioxan durchgeführt.*  
*Weitere Details zur Aufarbeitung sind in der Legende zur Abb. 3.5 aufgeführt.*  
*Die Bindungsdaten sind in fmol spezifisch gebundenem  $^{125}\text{J}$ -ANP pro mg Zellprotein als Mittelwert aus 3 Bestimmungen angegeben.*

Lösgrm.	Konzentration [Vol%]				
	Kontrolle	0,1 %	1 %	5 %	10 %
Ethanol	257,3	263,4	258,4	227,6	167,8
Aceton	257,3	264,4	245,4	175,3	100,8
DMSO	208,3	180,5	181,2	114,4	69,8
Dioxan	208,3	177,2	124,7	46,8	14,9

Zum Zwecke der Differenzierung zwischen Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten wurde ein Assay aufgebaut, der die Bestimmung des intrazellulären zyklischen GMPs mit Hilfe eines Radioimmunoassays erlaubt. Um die Empfindlichkeit dieser Bestimmungsmethode zu steigern, wird das gebildete und in Gegenwart von Isobutylmethylxanthin (IBMX) akkumulierte cGMP acetyliert, da der verwendete Antikörper eine höhere Affinität zum acetylierten cGMP besitzt (Steiner et al., 1972). Abbildung 3.8 zeigt die Abhängigkeit der Bildung intrazellulären zyklischen GMPs von der ANP-Konzentration im Inkubationsmedium. In diesem Modell wurden einige kompetitorisch schwach potente Substanzen (20-25 % Kompetition) aus der Pflanzenzellkultur untersucht. Unter dem für diese Untersuchungen essentiellen Zusatz des Phosphodiesterasehemmers

IBMX wurde mit Hilfe des erhöhten intrazellulären cGMP-Gehaltes eine agonistische Funktion nachgewiesen, wenn diese auch im Vergleich zum natürlichen Liganden ANP als therapeutisch uninteressant gewertet werden muß (Abb. 3.9).

*Tab. 3.12: Einfluß von Substanzen aus der Pflanzenzellkultur auf die Bindung von  $^{125}\text{J}$ -ANP.  
Die Vorinkubationen wurden wie in der Legende zur Abb. 3.5 beschrieben durchgeführt.  
Die Verdrängungsexperimente wurden mit 100 fmol/ml  $^{125}\text{J}$ -ANP für 30 Min. bei 4 °C in Gegenwart der angegebenen Substanzen ( $c = 10^{-6}$  mol/l) durchgeführt.  
Alle weiteren Details sind in der Legende zur Abb. 3.5 aufgeführt.*

Substanzen	$^{125}\text{J}$ -ANP-Bindung
	[% der Kontrolle]
NAT 18-007 11109	87,1
NAT 18-047 21120	94,3
NAT 18-001 11104	90,8
NAT 18-998 00402	80,0
NAT 18-789 11105	73,1
NAT 18-559 11109	94,2
NAT 18-177 11105	103,0
NAT 18-013 11114	109,6



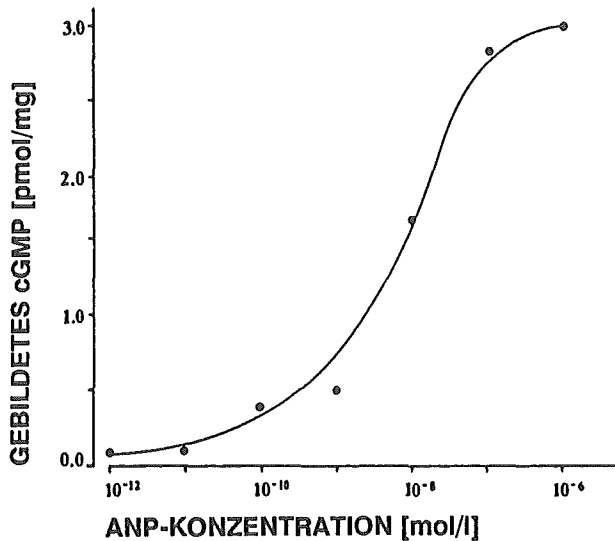


Abb. 3.8: Aktivierung der Guanylatzyklase in Kaninchenaortenzellen durch Ratten-ANP

Kaninchenaortenzellen (10. Passage) wurden 10 min in DMEM/0,1 % BSA/100  $\mu$ mol/l Isobutylmethylxanthin (IBMX) vorinkubiert. Ratten-ANP wurden in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt und die Inkubation für 30 Min. bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank fortgesetzt.

Zur Bestimmung des cGMP wurden die Monolayer anschliessend zweimal mit je 2 ml eiskaltem PBS, pH 7,4, gewaschen, abgeschabt und in 1 ml 6 %iger Trichloressigsäure ultrabeschallt. Nach Zentrifugation (2.500 x g, 15 Min.) wurde der Überstand mit Wasser-gesättigtem Diethylether extrahiert. Die wasserlösliche Fraktion wurde unter Stickstoffgasstrom bei 70 °C getrocknet, in Natriumacetatpuffer (0,05 mol/l, pH 6,2) gelöst, und nach Acetylierung für eine cGMP-Bestimmung nach Steiner et al., 1972, eingesetzt.

Angegeben sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen.

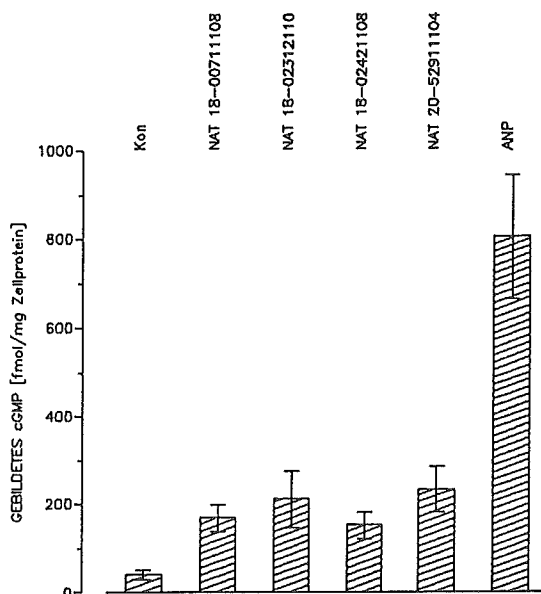


Abb. 3.9: Aktivierung der membrangebundenen Guanylatzyklase in Kaninchenaortenzellen.

Kaninchenaortenzellen wurden 10 min in DMEM/0,1 % BSA/100  $\mu\text{mol/l}$  Isobutylmethylxanthin (IBMX) vorinkubiert. Die angegebenen Substanzen ( $10^{-7}$  mol/l bei einer angenommenen Molmasse von 400 g/mol) wurden zugesetzt und die Inkubation für 120 min bei 37 °C im  $\text{CO}_2$ -begasteten Brutschrank fortgesetzt.

Zur Bestimmung des cGMP wurden die Monolayer anschließend zweimal mit je 2 ml eiskaltem PBS, pH 7,4, gewaschen, abgeschabt und in 1 ml 6 %iger Trichloressigsäure ultrabeschallt. Nach Zentrifugation ( $2.500 \times g$ , 15 min) wurde der Überstand mit Wasser-gesättigtem Diethylether extrahiert. Die wasserlösliche Fraktion wurde unter Stickstoffgasstrom bei 70 °C getrocknet, in Natriumacetatpuffer (0,05 mol/l, pH 6,2) gelöst und nach Acetylierung für eine cGMP-Bestimmung nach Steiner et al., 1972, eingesetzt.

Das Protein wurde mit der Methode nach Lowry et al. (1951), bestimmt.

Angegeben sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen.

Aus firmenstrategischen Erwägungen wurde dieses therapeutische Prinzip nicht weiter verfolgt. Die präsentierten Ergebnisse zeigen jedoch, daß mit der Kombination von Kompetitionsstudien und Untersuchung auf Agonisten-/Antagonisten-Funktion eine sehr effektive Auswahl von potenten Prüfsubstanzen erfolgen und damit die Anzahl der Untersuchungen im konventionellen Kreislaufmodellen drastisch gesenkt werden kann. Von ca. 200 bei uns untersuchten Substanzen waren nur

zwei (NAT 18-02312110 bzw. NAT 20-52911104) weiter verfolgenswert - 99 % der Prüfsubstanzen brauchten also nicht am Tier getestet zu werden! Da für den ANP-Kompetitionsassay mittlerweile Kits kommerziell erhältlich sind (z.B. ANAWA Laboratories, Nr. A3-220), läßt sich ein Grundscreening bei diesem neuen therapeutischen Konzept für Blutdrucksenkung und Herzinsuffizienz ohne Tierverbrauch sehr effizient durchführen.

### **3.8 Hemmung der Phosphodiesterase**

#### **3.8.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Die Phosphodiesterase III katalysiert spezifisch die Umwandlung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in Adenosinmonophosphat (AMP), das sich nach Abspaltung des Phosphat-Restes mit einem Hilfsenzym ionenaustauschchromatographisch von dem nicht umgesetzten Substrat abtrennen und bei Verwendung radioaktiv markierten Substrates szintillationsluminometrisch quantifizieren läßt. In Gegenwart von Inhibitoren wird weniger Adenosinmonophosphat bzw. Adenosin gebildet. Zur Beurteilung der Inhibitor-Wirkung dient die Inhibitor-Konzentration, bei der die Enzym-Aktivität zu 50 % gehemmt wird ( $IC_{50}$ -Wert).

Der Test erlaubt das Auffinden von inhibitorisch wirksamen Substanzen, macht aber erst nach Vergleichsuntersuchungen mit den Phosphodiesterasen I und II Aussagen über die Spezifität der Inhibition möglich. Inhibitoren der Phosphodiesterase III, die eine besondere Bedeutung in der Herzmuskulatur, in der glatten Gefäßmuskulatur und in den Thrombozyten hat, könnten als positiv inotrop wirksame Pharmaka bei Herzinsuffizienz, als Gefäßdilatoren bei Bluthochdruck und als Antithrombotika bei arteriellen Verschlusskrankheiten und in der Nachsorge des Herzinfarktes eingesetzt werden.

#### **3.8.2 Material und Methoden**

##### **3.8.2.1 Reagenzien und Chromatographiematerial**

- a) Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate - free acid (Sigma, A 4137)
- b) Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate - free acid (Sigma, G 7504)
- c) 2,8-<sup>3</sup>H-Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate-Ammoniumsalz; spez. Akt. 31,2 Ci/mmol, Ethanol:Wasser (1:1; v/v) (NEN, NET 275)
- d) 8-<sup>3</sup>H-Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate-Ammoniumsalz; spez. Akt. 5,04-10,3 Ci/mmol, Ethanol:Wasser (1:1, v/v) (NEN, NET 337)

- e) Schlangengift - Venom Snake, Ophiophagus hannah (King Cobra) (Sigma, V-0376)
- f) Kationenaustauscher; Analytical Grade Cation Exchange Resin AG 50W-X8; 100-200 mesh, hydrogen form (BioRad, 142-1441)
- g) 2-Mercaptoethanol (Merck, 805740 oder Sigma, M-6250)
- h) Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma, T-1503)
- i) Magnesiumchlorid x 6 H<sub>2</sub>O (Merck, 5833)
- k) Instagel II (Packard, 6013015)
- l) Dextran T500 (Pharmacia, 17-0320-02)

### 3.8.2.2 Puffer

- a) "PDE-isolation buffer" (Weishaar et al., 1986)

10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5  
 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
 1 mmol/l 2-Mercaptoethanol

- b) Assay-Puffer

Stammlösung: 0,8 mol/l Tris-HCl, pH 8,0  
 0,1 mol/l MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

Für die Bestimmung der Aktivität der PDE wird dieser Puffer 1:20 mit Aqua bidest. verdünnt und 2-Mercaptoethanol in einer Konzentration von 5 mmol/l zugesetzt.

### 3.8.2.3 Substratlösungen

- a) nicht-radioaktiv markierte Substrate

Als nicht-radioaktiv markierte Substrate werden cAMP und cGMP in einer Endkonzentration von 1 µmol/l im Reaktionsansatz eingesetzt. Die Stammlösungen (4 x 10<sup>-3</sup> mol/l) werden mit Assay-Puffer 1:1000 verdünnt und dem Reaktionsansatz als 4 x 10<sup>-6</sup> mol/l-Lösung zugesetzt.

- b) radioaktiv markierte Substrate

<sup>3</sup>H-cAMP und <sup>3</sup>H-cGMP werden so mit Assay-Puffer verdünnt, daß 100 µl dieser Lösung etwa 0,2 µCi enthalten.

- c) Schlangengift-Lösung

1 mg/ml Aqua bidest.

#### 3.8.2.4 Bestimmung der Aktivität der Phosphodiesterase

Im Eisbad wird in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert:

100 µl nicht-radioaktiv markierte Substrat-Lösung

100 µl radioaktives Substrat

100 µl Assay-Puffer oder Inhibitor-Lösung

Die Testsubstanzen werden - falls in  $H_2O$  unlöslich - in DMSO vorgelöst und dann entsprechend mit Assay-Puffer verdünnt, so daß die Endkonzentration an DMSO im Reaktionsansatz 2,5 % beträgt. In diesem Fall enthält auch die Kontrolle 2,5 % DMSO.

Nach Vorinkubation bei 30 °C im Schüttelwasserbad (5 min) werden jeweils 100 µl Enzym-Lösung, die vorher ebenfalls auf 30 °C erwärmt worden ist, im Abstand von 10 sec zupipettiert. Nach 10 min Inkubation bei 30 °C im Schüttelwasserbad wird die Inkubation durch Überführung der Reaktionsgefäße in kochendes Wasser (45 sec) beendet. In einem Eisbad werden 100 µl Schlangengift zugesetzt, und die Inkubation 10 min bei 30 °C im Schüttelwasserbad fortgeführt. Die Proben werden an AG 50W-X8 chromatographiert (100-200 mesh;  $H^+$ -Form; Minisäule = Pasteurpipette). Die Säule ist mit 3 ml 10 % Ethanol äquilibriert. Nachdem die Proben aufgetragen sind, wird mit 20 ml 10 % Ethanol gespült. Die Elution des gebundenen  $^3H$ -Adenosins bzw.  $^3H$ -Guanosins erfolgt mit 10 ml 3 mol/l Ammoniak in 10 % Ethanol. 1 ml des Eluats wird mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Packard, Instagel II) versetzt und im LKB-Counter szintillationsluminometrisch quantifiziert.

Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität im Ansatz werden

100 µl nicht-radioaktiv markiertes Substrat

100 µl radioaktiv markiertes Substrat

200 µl Assay-Puffer

600 µl 3 mol/l Ammoniak-Lösung in 10 % Ethanol

gemischt, mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und quantifiziert.

Als weitere Kontrolle (Blindwert) dient ein Ansatz mit  
 100 µl nicht-radioaktiv markiertem Substrat  
 100 µl radioaktivem Substrat  
 200 µl Assay-Puffer  
 100 µl Schlangengift.

Dieser Ansatz enthält keine Phosphodiesterase und wird wie die übrigen Ansätze behandelt und chromatographiert.

Die PDE-Aktivität wird folgendermaßen bestimmt:

$$\frac{[(\text{gezählte Counts in dpm} \times \text{Elutionsvol.}) - \text{Blindwert}] \times \text{Substrat} (= 0,4 \text{ nmol}) \times 1000 \times 2,5}{(\text{Gesamtradioaktivität} - \text{Blindwert}) \times \text{Inkubationszeit [min]}}$$

= 
$$\frac{\text{pmol hydrolysiertes Substrat}}{\text{min} \times \text{ml}}$$

Das Ergebnis gibt den Umsatz in pmol pro min und ml Reaktionsansatz an. Ein Unit Enzym ist die Enzymmenge, die 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt. Bei der Prüfung von Substanzen wird ihr Umsatz als prozentuale Inhibition zur Kontrolle (= 100 %) dargestellt.

#### **3.8.2.5 Gewinnung von Phosphodiesterase-Aktivität aus Kaninchenherzen**

Acht Kaninchenherzen (≈ 60 g) werden vollständig von Fettgewebe und von den Vorhöfen befreit. Die Herzkammern werden aufgeschnitten, mehrfach mit "PDE-isolation buffer" gespült, um die Erythrozyten zu lysieren. Die Herzstücke werden anschließend in eiskaltem Aqua demin. gespült und mit Schere oder Skalpell zerkleinert. Durch Homogenisation mit einem Waring-Labormixer (Bender & Hobein; Motorleistung 840 W; 20.000/15.600<sup>-1</sup> U) für 30 sec bei 15.600 U/min und 60 sec bei 20.000 U/min und anschließend mit einem Homogenisator vom Potter-Elvehjem-Typ bei 1.200-1.300 Upm während 30-60 sec wird ein Homogenat erhalten, das noch 30 sec/ml bei 40-50 W im Eisbad ultrabeschallt und anschließend 20 min bei 4 °C und 30000 x g in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert wird. Der Überstand wird gesammelt, das Sediment wird noch einmal mit kaltem Aqua demin. aufgeschüttelt, abermals homogenisiert und ultrabeschallt und erneut zentrifugiert. Die Überstände werden vereinigt, 30 % an Ethylenglykol, 5 mmol/l an Glucose,

5 mmol/l an 2-Mercaptoethanol gemacht und 0,1 %  $\text{NaN}_3$  zugesetzt. Die Zusätze dienen als Stabilisatoren für die relativ labile Enzymaktivität. Zur Auftrennung in die einzelnen Isoenzyme wird diese PDE-Präparation einer Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel unterzogen, die unter 3.8.2.8 beschrieben ist.

#### **3.8.2.6 Gewinnung von Phosphodiesterase-Aktivität aus Schweineaorta**

Etwa 5 Schweineaorten werden von anhängendem Fett und von der Adventitia befreit, mit "PDE-isolation buffer" mehrfach gewaschen und in kleine Stücke geschnitten. Unter Verwendung eines Waring-Labormixers (Bender & Hobein, Motorleistung 840 W;  $20.000/15.600^{-1}$  U) wird ein Homogenat hergestellt, das anschließend 30 sec/ml bei 40 W im Eisbad ultrabeschallt wird. Nach Zentrifugation für 20 min bei  $30.000 \times g$  wird der Überstand gesammelt, das Sediment wird nochmals homogenisiert und zentrifugiert, und die Überstände werden vereinigt. Zur anschließenden Chromatographie werden die Überstände mit 30 % Ethylenglykol, 5 mmol/l Glucose und 5 mmol/l 2-Mercaptoethanol versetzt, und 0,1 % Natriumazid hinzugefügt.

#### **3.8.2.7 Gewinnung von Phosphodiesterase-Aktivität aus Schweine-Thrombozyten**

Zwei Liter Schweineblut werden in einem Plastikgefäß gesammelt, in dem sich 9 g Na-citrat/200 ml 0,9 % NaCl und 200-400  $\mu\text{l}$  Liquemin (250000 I.E.) befinden, um eine Gerinnung zu verhindern. Das Schweineblut wird dann mit 400 ml 6 % Dextran T-500 in 0,9 % NaCl versetzt. Nach 1 h Stehenlassen wird der Überstand 10 min bei 1.000 U/min ( $\approx 100-500 \times g$ ) zentrifugiert, um die Leukozyten von den Thrombozyten abzutrennen. Die Thrombozyten befinden sich im Überstand und werden anschließend 15 min bei 4 °C und  $5.100 \times g$  in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen; das Sediment wird zweimal mit "PDE-isolation buffer" gewaschen und in 50 mmol/l Natriumacetat-Puffer pH 6,5 aufgenommen. Nach Homogenisation mit dem Potter-Elvehjem-Homogenisator und anschließender Ultrabeschallung im Eisbad (30 sec/ml; 40-50 W) wird bei  $30.000 \times g$  und 4 °C in einer Kühlzentrifuge (Beckman J2-21) zentrifugiert. Der Überstand wird gesammelt; das Sedi-



ment wird nochmal in 50 mmol/l Natriumacetat-Puffer pH 6,5 aufgenommen, homogenisiert, beschallt und erneut zentrifugiert.

Die Überstände werden vereinigt und 30 %ig an Ethylenglykol, 5 mmol/l an Glucose, 5 mmol/l an 2-Mercaptoethanol und 0,1 %ig an Natriumazid gemacht.

#### **3.8.2.8 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel**

Zur Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel (Pharmacia 170500-01) wird eine Chromatographie-Säule der Fa. LKB (2137) mit einer Säulenlänge von 35 cm (Gelbettlänge 30 cm) und einem Innendurchmesser von 2,6 cm verwendet. Das Gelvolumen beträgt etwa 160 ml. Die Säule wird mit 50 mmol/l Natriumacetat-Puffer pH 6,5 äquilibriert, der 5 mmol/l an Glucose, 5 mmol/l an 2-Mercaptoethanol und 30 %ig an Ethylenglycol ist.

Die jeweilige Phosphodiesterase-Präparation (s. 3.8.2.5-3.8.2.7) wird aufgetragen. Man spült mit dem Äquilibrierungspuffer so lange, bis das Eluat proteinfrei ist (Kontrolle durch UV-Detektion mittels eines LKB-Uvicords S II 2238 bei 280 nm). Die Phosphodiesterase-Aktivität läßt sich eluieren mit 2 x 700 ml eines Gradienten von 0,05-1 mol/l Natriumacetat-Puffer, der Ethylenglycol, Glucose und Mercaptoethanol in den oben angegebenen Mengen enthält. In den 7,5-7,8 ml-Fraktionen wird photometrisch die Proteinkonzentration über die Absorption bei 280 nm und die Aktivität der Phosphodiesterase mit cAMP bzw. cGMP als Substrat bestimmt.

Die PDE III läßt sich identifizieren durch eine parallele Aktivitätsbestimmung in Gegenwart von Motapizon (Nattermann-Forschungssubstanz), das ein selektiver Inhibitor der PDE III darstellt.

Die Motapizon-hemmbareren Fraktionen werden vereinigt und nach Dialyse gegen 0,1 mol/l Natriumacetat-Puffer pH 6,5 mit den eben genannten Zusätzen an DEAE-Sephacel rechromatographiert (Säulenlänge 19 cm;  $\phi$  1,5 cm). Die PDE-Aktivität wird mit 2 x 150 ml eines Gradienten mit 0,1-0,8 mol/l Natriumacetat-Puffer pH 6,5 und den beschriebenen Zusätzen eluiert. Die Fraktionen mit PDE-Aktivität werden vereinigt, durch Ultra-

filtration konzentriert, dialysiert und portionsweise tiefgefroren.

### **3.8.3 Ergebnisse und Diskussion**

Phosphodiesterase-III-Aktivität konnte aus Ratten- und Kaninchenherzen, Schweinethrombozyten und -arteriengewebe isoliert, durch Ionenaustauschchromatographie angereichert und von den Phosphodiesterasen I und II abgetrennt werden. Exemplarisch sind die Elutionsprofile nach Chromatographie der PDE aus Herzgewebe der Ratte (Abb. 3.10) und aus Schweinethrombozyten (Abb. 3.11) gezeigt.

Die Phosphodiesterase III kann dabei deutlich von der Phosphodiesterase I abgetrennt werden, ist aber - wie die Aktivitätsbestimmung in Gegenwart von cGMP zeigt - nicht frei von PDE-II-Aktivität. Nach Rechromatographie war - gemessen an der Inhibition durch Motapizon - die Phosphodiesterase aus Thrombozyten zu 100 %, die aus Herzgewebe zu mehr als 90 % und die aus Schweineaorten zu etwa 80 % frei von anderen Phosphodiesterasen. Die Mehrgipfeligkeit des Elutionsprofils für die PDE III, die bei allen Präparationen gefunden wurde, spricht für die Existenz multipler Formen mit unterschiedlichem isoelektrischem Punkt (bedingt durch z.B. unterschiedlichen Sialinsäure-Anteil). Kinetisch erwiesen sich nach mehrfacher Rechromatographie diese multiplen Formen als identisch.

Mit den gewonnenen reinen Enzymen wurden etwa 50 Verbindungen aus der Klasse der Pyridazinone und Pyridone auf ihre Hemmwirkung der PDE-III-Aktivität hin geprüft. In den Abbildungen 3.12, 3.13 und 3.14 sind anhand von Konzentrations-Wirkungskurven die Ergebnisse dargestellt, die mit vier repräsentativen Verbindungen erzielt worden sind. Die bei diesen Untersuchungen eingesetzte PDE-III aus Arteriengewebe des Schweines erwies sich dabei, wie bereits erwähnt, als zu 20 % mit PDE-II kontaminiert. Die Konzentrations-Wirkungskurven zeigen, daß keine der Verbindungen eine besondere Selektivität für die PDE-III eines bestimmten Gewebes aufweist - ein Ergebnis, das auch mit den anderen geprüften Verbindungen erzielt wurde (Tab. 3.13).

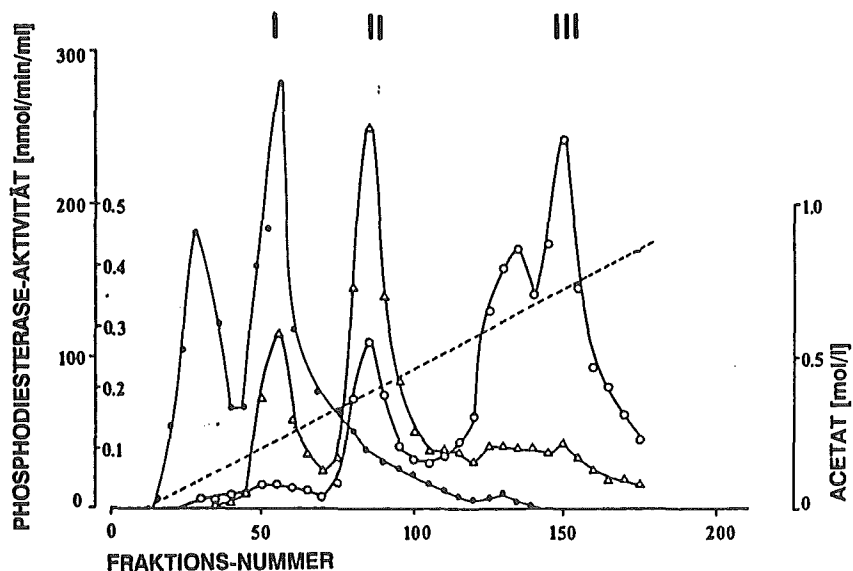


Abb. 3.10: Trennung der Isoformen von Phosphodiesterase (PDE) aus Rattenherz durch Anionenaustauscherchromatographie an Diethylaminoethyl (DEAE)-Zellulose. Das Homogenat aus 11,4 g Herzgewebe wurde ultraschallt, bei 30.000 x g für 20 min zentrifugiert und der Überstand auf eine DEAE-Zellulosesäule (30 x 2,6 cm, DEAE-Sephacel, Pharmacia), welche zuvor mit 50 mmol/l Natriumacetat, pH 6,5, äquilibriert worden war, aufgetragen. Die Säule wurde mit 2-3 Säulenvolumina Natriumacetatpuffer, welcher 5 mmol/l 2-Mercaptoethanol, 30 % Ethylenglycol und 5 mmol/l Glukose enthielt, gewaschen. Die Phosphodiesterasen wurden mit einem linearen Natriumacetatgradienten im Konzentrationsbereich von 50 bis 1000 mmol/l, gelöst in oben aufgeführten Puffer, mit einem Gesamtgradientenvolumen von 1400 ml eluiert. Die Säulenfraktionen (7,6 ml) wurden ohne weitere Aufarbeitung zur Proteinbestimmung (Absorption bei 280 nm, ●) und der Enzymaktivitätsbestimmung mit 1,0 µmol/l <sup>3</sup>H-markiertem zyklischem AMP (○) bzw. 1,0 µmol/l <sup>3</sup>H-markiertem zyklischem GMP (Δ) als Substrat eingesetzt.

Somit konnte weder ein selektiver Inhibitor der Thrombozyten-PDE-III gefunden werden, der als antithrombotisch wirksame Substanz hätte Verwendung finden können, noch ein selektiver Inhibitor der Herz-PDE-III, der positiv inotrop wirksam und damit die Herzkraft steigern könnte. Tierexperimentell konnte belegt werden, daß die geprüften Substanzen sowohl positiv inotrop, antiaggregatorisch als auch gefäßdilatatorisch wirksam waren.

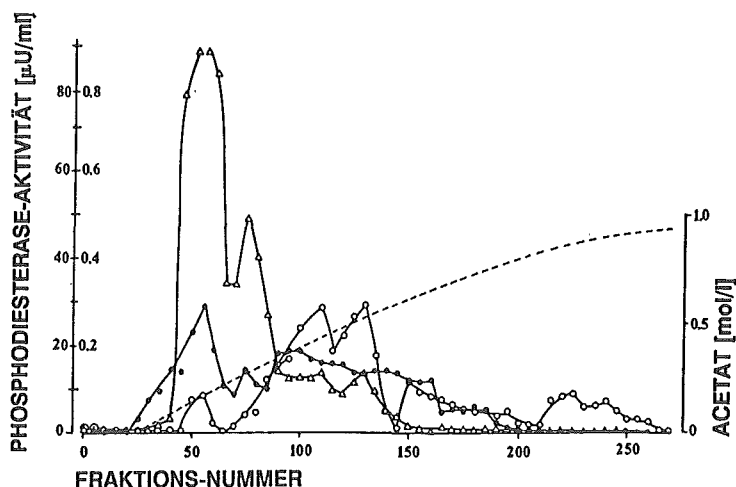


Abb. 3.11: Trennung der Isoformen von Phosphodiesterase (PDE) aus Schweinethrombozyten durch Anionenaustauscherchromatographie an Diethylaminoethyl (DEAE)-Zellulose.

Schweinethrombozyten wurden aus 1,8 l Blut unter Zusatz von 200 ml 0,95 %iger NaCl-Lösung, welche 3,8 % Natriumcitrat und Liguemin (50.000 U/l) enthielt, durch Sedimentation der Erythrozyten in 6 % Dextran T-500/0,95 % NaCl und Zentrifugation (500 x g, 10 min) gewonnen. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (1000 x g, 10 min), das Sediment zweimal mit 10 mmol/l Tris/HCl Puffer (pH 7,5), welcher 2 mmol/l  $MgCl_2$  und 1 mmol/l 2-Mercaptoethanol enthielt, gewaschen, mittels eines Potter-Elvehjem-Homogenisator und Ultraschallung homogenisiert und bei 30.000 x g für 20 min zentrifugiert. Nach Zusatz von 5 mmol/l Glukose, 30 % Ethylenglycol und 5 mmol/l 2-Mercaptoethanol, wurde die Lösung auf eine DEAE-Zellulosesäule (30 x 2,6 cm, DEAE-Sephacel, Pharmacia), welche zuvor mit 50 mmol/l Natriumacetat, pH 6,5, äquilibriert worden war, aufgetragen.

Die Säule wurde mit 2-3 Säulenvolumina Natriumacetatpuffer, welcher 5 mmol/l 2-Mercaptoethanol, 30 % Ethylenglycol und 5 mmol/l Glukose enthielt, gewaschen. Die Phosphodiesterasen wurden mit einem linearen Natriumacetatgradienten im Konzentrationsbereich von 50 bis 1000 mmol/l, gelöst in oben aufgeführten Puffer, mit einem Gesamtgradientenvolumen von 1400 ml eluiert.

Die Säulenfraktionen (7,6 ml) wurden ohne weitere Aufarbeitung zur Proteinbestimmung (Absorption bei 280 nm, ●) und der Enzymaktivitätsbestimmung mit 1,0 μmol/l  $^3H$ -markiertem zyklischem AMP (○) bzw. 1,0 μmol/l  $^3H$ -markiertem zyklischem GMP (Δ) als Substrat eingesetzt.

Eine klare Korrelation der in vitro erzielten Ergebnisse zu den In-vivo- und Ex-vivo-Befunden konnte wohl qualitativ, nicht jedoch quantitativ erzielt werden. Dafür könnten einerseits die pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanzen, andererseits aber auch die Verwendung unterschiedlicher Tierpezies (in vivo: Ratte, Hund; in vitro: Kaninchen, Schwein) verantwortlich sein. Dennoch konnten die von uns durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß man mit dem Testsystem "Hemmung der PDE-III" - zumeist unter Verwendung von Material vom Schlachthof - Substanzen auffinden kann, die die drei oben beschriebene Wirkqualitäten aufweisen.

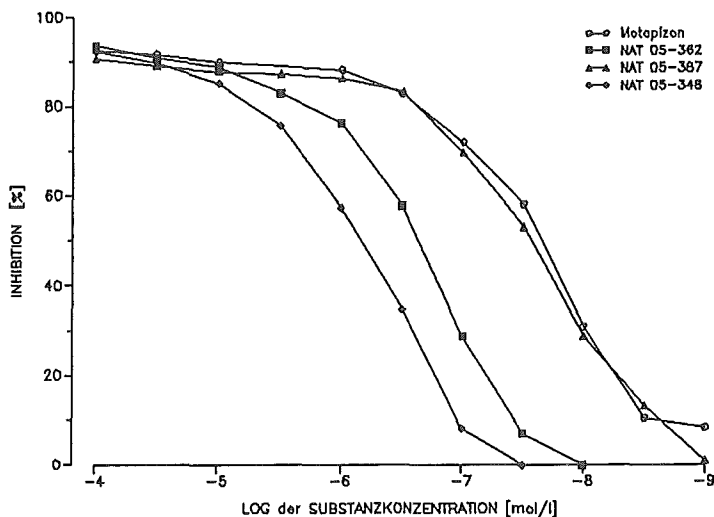


Abb. 3.12: Inhibition der Phosphodiesterase III aus Kaninchenherz in Abhängigkeit von der Konzentration vier verschiedener Nattermann-Substanzen. Die Präparation der Phosphodiesterase III aus Kaninchenherz erfolgte, wie im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben.

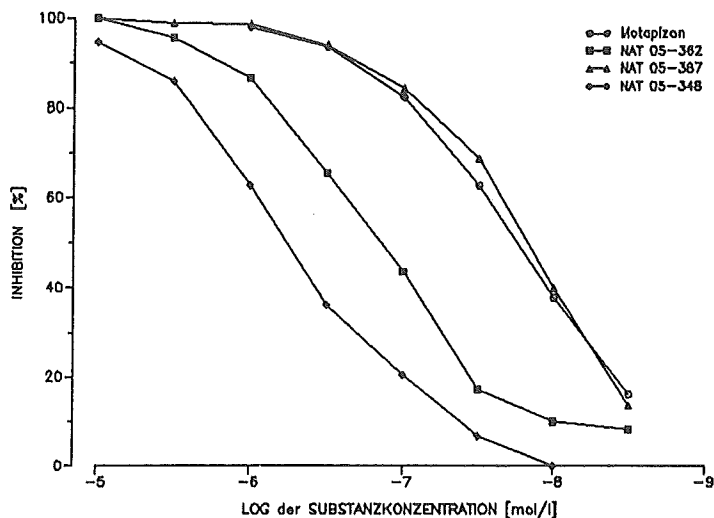


Abb. 3.13: Inhibition der Phosphodiesterase III aus Schweinethrombozyten in Abhängigkeit von der Konzentration vier verschiedener Nattermann-Substanzen. Die Präparation der Phosphodiesterase III aus Schweinethrombozyten erfolgte, wie im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben.

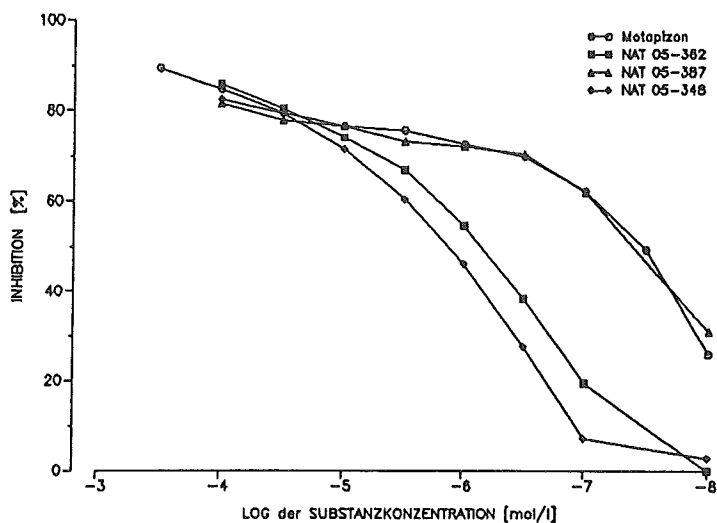


Abb. 3.14: Inhibition der Phosphodiesterase III aus Schweinearterien in Abhängigkeit von der Konzentration vier verschiedener Nattermann-Substanzen. Die Präparation der Phosphodiesterase III aus Schweinearterien erfolgte, wie im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben.

Tab. 3.13: Inhibitorische Potenz ( $IC_{50}$ -Werte) einiger Referenz- bzw. Testsubstanzen auf die PDEs aus verschiedenen Geweben.

Substanz	Schweine- aorten [mol/l]	Schweine- thrombozyten [mol/l]	Kaninchenherz [mol/l]
CI-930	$5,1 \times 10^{-6}$	$1,7 \times 10^{-7}$	$2,1 \times 10^{-7}$
Milrinon	$1,6 \times 10^{-6}$	$9,1 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-6}$
BM 14478	$1,0 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-7}$	$9,7 \times 10^{-7}$
Pimobendan	$8,2 \times 10^{-7}$	$5,2 \times 10^{-7}$	$7,1 \times 10^{-7}$
Y-590	$2,0 \times 10^{-8}$	$9,0 \times 10^{-9}$	$1,5 \times 10^{-8}$
Motapizon	$2,8 \times 10^{-8}$	$2,0 \times 10^{-8}$	$2,7 \times 10^{-8}$
NAT 05-362	$7,0 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-7}$	$2,6 \times 10^{-7}$
NAT 05-387	$4,7 \times 10^{-8}$	$1,4 \times 10^{-8}$	$3,2 \times 10^{-8}$
NAT 05-351	$4,1 \times 10^{-7}$	$4,7 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-6}$
NAT 05-348	$1,7 \times 10^{-6}$	$7,3 \times 10^{-7}$	$8,5 \times 10^{-7}$
NAT 03-434	$3,1 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$
NAT 05-317	$5,7 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^{-6}$	$5,2 \times 10^{-6}$
NAT 05-433	$3,2 \times 10^{-8}$	$7,7 \times 10^{-9}$	$1,8 \times 10^{-8}$
NAT 05-438	$3,9 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-7}$
NAT 05-344	$2,2 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^{-6}$
NAT 05-429	$1,6 \times 10^{-5}$	$6,7 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$
NAT 05-430	$4,1 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$	$4,1 \times 10^{-5}$

#### 4. IN-VITRO-TESTVERFAHREN ZUR AUFFINDUNG VON ANTIATHEROSKLEROTISCH WIRKENDEN SUBSTANZEN

##### 4.1 Einführung

##### 4.1.1 Plasma-Cholesterin und Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die Haupttodesursache in den Vereinigten Staaten und Westeuropa dar. Verantwortlich für die Mehrzahl dieser Todesfälle ist die Atherosklerose, die Hauptursache von Herz- und Hirninfarkten (Report of the Working group of Arteriosclerosis of the National Heart, Lung and Blood Institute, 1981). Neben erhöhtem Blutdruck, Rauchen und Fettleibigkeit ist die Hypercholesterinämie der Hauptrisikofaktor für die koronare Herzkrankheit.

Bei der Atherosklerose gibt es zwei herausstechende Prozesse, die Wanderung glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima und deren Proliferation und die Fettspeicherung in der Arterienwand.

Es gibt keinen Zweifel über die Assoziation zwischen Hypercholesterinämie und progredienter Atherosklerose (Assmann et al., 1988). Aus verschiedenen epidemiologischen und klinischen Studien wurde die Korrelation zwischen der Konzentration an "low-density-lipoprotein-(LDL-)Cholesterin und atherosklerotischer Gefäßerkrankung deutlich. In den Studien "Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial (LRC-CPPT)" (Lipid Research Clinics Program, 1984) und "Helsinki Heart Study" (Frick et al., 1987) konnte eine klare Korrelation zwischen der Reduktion des Serumspiegels an Cholesterin und der Reduktion des Risikos neuer oder wiederkehrender Manifestationen der koronaren Herzerkrankung demonstriert werden. Dabei war die Risikoreduktion in der "Helsinki Heart Study" sogar ausgeprägter im Vergleich zur Cholesterinsenkung als in der LRC-CPPT. Die besseren Ergebnisse der Helsinki-Studie, die mit Gemfibrozil als Lipidsenker durchgeführt wurde, wurde dem zusätzlichen Anstieg des HDL-Cholesterins zugesprochen, von dem man annimmt, daß es kardioprotektiv ist. Diese Interpretation wird unterstützt durch die Ergebnisse verschiedener epidemiologischer Studien, in



denen herausgefunden wurde, daß HDL-Cholesterin, das Verhältnis von Gesamt- und HDL-Cholesterin oder ApoA-I (dem Hauptprotein in den HDL-Partikeln) invers korreliert war mit dem Risiko der koronaren Herzerkrankung (Yaari et al., 1981; Kannel et al., 1979; Wilson et al. 1980; Gordon et al., 1980; Arntzenius et al., 1985; Assmann, 1985; Nikkilä et al., 1984; Assmann et al., 1985; Kottke et al., 1983; Kottke, 1986).

Hohe HDL- oder HDL<sub>2</sub>-Cholesterin-Spiegel im Plasma könnten daher eine metabolische Situation anzeigen, in der der Cholesterin-Transport in periphere Gewebe kompensiert wird durch den "reverse cholesterol transport" zurück zur Leber, der im wesentlichen durch HDL-Partikel vermittelt sein dürfte. So sollten auch Pharmaka, die den "reverse cholesterol transport" stimulieren, zu Änderungen der HDL- oder HDL<sub>2</sub>-Cholesterin-Konzentration im Plasma führen.

#### *4.1.2 Makrophagen und Atherogenese (Review Kottke, 1986)*

Die Analyse menschlicher atherosklerotischer Läsionen mit Hilfe histochemischer Methoden (Adams and Bayliss, 1976; Schaefer, 1981; Assmann, 1982), Elektronenmikroskopie (Stary, 1983) und Oberflächenmarkern (Vedeler et al., 1984; Agel et al., 1984; Agel et al., 1985; Klurfeld, 1985; Jonasson et al., 1986; Gown et al., 1986) haben die Beteiligung von Makrophagen bei der menschlichen Atherosklerose deutlich gemacht. Diese stellen die "Schaumzellen" dar, deren Zytoplasma voll von Fetttröpfchen ist und die die Hauptmenge der Zellen in kleinen Läsionen ("fatty streaks") und an den Ecken der schon voll entwickelten Plaques darstellen.

Glatte Muskelzellen befinden sich in der diffusen Verdickung der Intima, auf die die Fettstreifen aufgelagert sind (Agel et al. 1985). Diese Zellen sind in steigender Zahl in größeren Läsionen zu finden und stellen den Hauptzelltyp in der fibrösen Kappe der fortgeschrittenen Plaques (Agel et al., 1985; Klurfeld, 1985; Jonasson et al., 1986; Gown et al., 1986) dar. Die Veränderung ihres Phenotyps zu einer sekretorischen Zelle in Läsionen könnte durch ein Makrophagen-Produkt verursacht sein (Campbell, 1986). Das entscheidende Ereignis bei der Fett-induzierten Atherosklerose könnte die Umwandlung des Fett-akkumulierenden Makrophagen in eine akti-

vierte Zelle sein mit reduzierter Apoprotein-E-Synthese, aber Sekretion einer Anzahl von Faktoren, Wachstumsfaktoren eingeschlossen (Abb. 4.1).

Es ist bis heute nicht vollständig geklärt, ob - in Ergänzung zur Fettakkumulation - Entzündungsmediatoren wie Interferon, Interleukin-2 oder peroxidierte Lipide an den beschriebenen Veränderungen der Makrophagen-Funktion beteiligt sind.

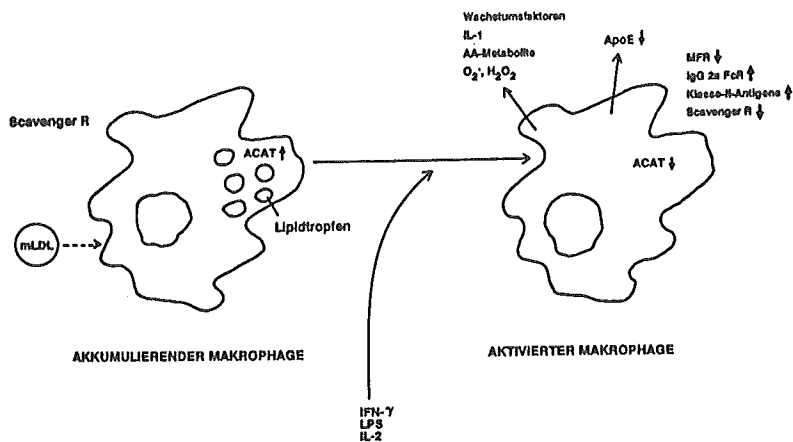


Abb. 4.1: Aktivierung von Makrophagen und Transformation von einem akkumulierenden Zelltyp mit hoher ACAT- bzw. Scavenger-Rezeptor-Aktivität und ApoE-Syntheserate bzw. -Sekretion zu einer Zelle mit geringer Scavenger-Rezeptor- und ACAT-Aktivität, reduzierter ApoE-Sekretion, geringer Mannose-Fucose-Rezeptor-(MFR-) Aktivität und hohen Sekretionsraten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Arachidonsäuremetaboliten (AS-Metaboliten), Interleukin-1 (IL-1) und Wachstumsfaktoren.

#### 4.1.3 Regulation der Cholesterin-Abgabe ("cholesterol efflux")

Der Mechanismus der Cholesterin-Akkumulation in Makrophagen ist intensiv in den letzten Jahren von der Arbeitsgruppe von Schmitz (1988a) und anderen untersucht worden. Dabei konnte gezeigt werden, daß chemisch modifiziertes LDL,  $\beta$ -VLDL, durch Endothelzellen modifiziertes LDL und andere atherogene Lipoproteine von Makrophagen aufgenommen und in den Lysosomen abgebaut werden. Das Cholesterin wird aus den Lysosomen freigesetzt und entweder von den Zellen reseziert (in Gegenwart physiologische Akzeptoren wie  $HDL_3$ ) oder wieder verestert im Zytoplasma durch Katalyse der Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT), die Cholesterin mit einer Fettsäure - hauptsächlich Ölsäure - verknüpft (siehe Abb. 4.2). Die Hydrolyse der Cholesterinester im Zytoplasma wird durch eine neutrale Cholesterinester-Hydrolase (CEH) vermittelt, die möglicherweise an der Oberfläche der zytoplasmatischen Fetttropfen lokalisiert ist.

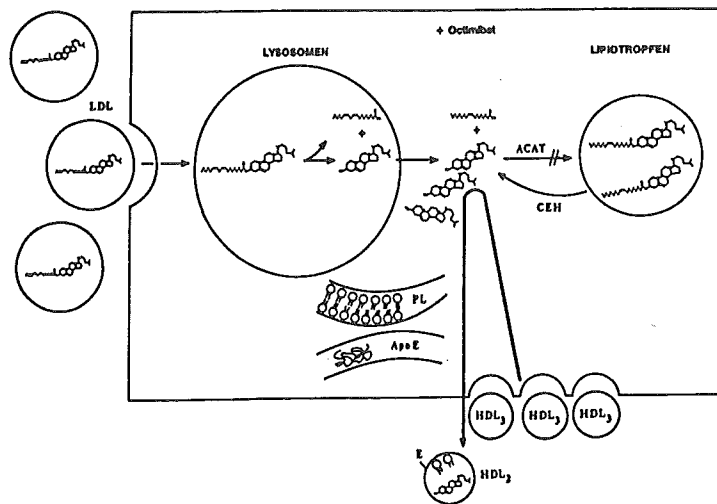


Abb. 4.2: Cholesterinmetabolismus in Makrophagen. Eine ACAT-Inhibition führt zu einem erhöhten Angebot an freiem Cholesterin, einer erhöhten Phospholipidsynthese und einer stimulierten HDL-Rezeptor-Aktivität (Octimibat = ACAT-Inhibitor der Fa. Nattermann).

Das durch Katalyse der CEH entstehende freie Cholesterin wird sofort wieder verestert, wenn es nicht durch physiologische Akzeptoren wie z.B. HDL<sub>3</sub> aufgenommen werden kann. Mit Hilfe biochemischer und morphologischer Verfahren konnte gezeigt werden, daß ApoA-I-enthaltende HDL-Partikel an spezifische Oberflächenrezeptoren von Makrophagen binden (Schmitz et al., 1985). ApoA-I, das Hauptprotein der HDL-Partikel, stellt dabei den Liganden für diesen Rezeptor dar.

In-vitro-Untersuchungen belegen, daß die Beladung von Makrophagen mit Cholesterin in einer Aufwärtsregulation der HDL-Rezeptor-Aktivität innerhalb der ersten sechs Stunden führt, wobei dann die HDL-Bindung zurückgeht, während gleichzeitig die ACAT deutlich aktiviert wird (Schmitz et al., 1988b). Der Mechanismus der Aufnahme von Cholesterin durch HDL-Partikel ist noch nicht im Detail geklärt. So konnte auf der einen Seite experimentell belegt werden, daß HDL-Partikel nach ihrer Bindung an den HDL-Rezeptor von der Zelle aufgenommen werden, freies Cholesterin von den Cholesterin-reichen sogenannten "lamellar bodies", die Lipide der zytoplasmatischen Fetttröpfchen enthalten, aufnehmen und dann reseziert werden, auf der anderen Seite gibt es Hinweise, daß allein die Bindung von ApoA-I an den HDL-Rezeptor eine Translokation von Cholesterin Richtung Zellmembran bewirkt, von wo das Cholesterin durch HDL-Partikel ohne Eintritt in die Zelle aufgenommen werden kann (Aviram et al., 1989). Möglicherweise treffen beide Mechanismen für unterschiedliche HDL-Spezies zu. Die Abgabe des Cholesterins scheint an den Phospholipid-Metabolismus geknüpft zu sein. Während der Beladung mit Cholesterin ist die Phospholipid-Synthese nach einer anfänglichen Aufwärtsregulation reduziert, wobei diese Reduktion vollständig in Gegenwart von ApoA-I-haltigen HDL<sub>3</sub>-Partikeln aufgehoben werden kann (Schmitz et al., 1985).

Aus diesen und anderen Ergebnissen, die z.T. Gegenstand dieses Berichts sind, kann geschlossen werden, daß der durch HDL-Partikel vermittelte "cholesterol efflux" mit einer stimulierten Phospholipid- und ApoE-Synthese verknüpft ist (s. Abb. 4.2).

#### **4.1.4 Entwicklung von Modellen zur Entdeckung und Verifizierung neuer therapeutischer Prinzipien**

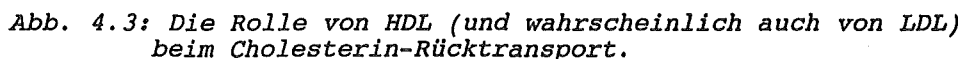
Das gegenwärtige Ziel der Pharmakotherapie der Hyperlipidämie ist die Reduktion des Gesamtcholesterins im Serum und des LDL-Cholesterins. Eine Reduktion des Cholesterin-Transports in periphere Gewebe wie z.B. die Arterienwände könnte - wenigstens teilweise - physiologische Mechanismen aktivieren, die für den "reverse cholesterol transport" verantwortlich sind. Die Frage bleibt jedoch bestehen, ob diese Art von Therapie zu einer signifikanten Mobilisierung einmal gespeicherten Cholesterins und damit zu einer Regression führen kann.

Eine weitgehende Unkenntnis über die Mechanismen der Cholesterin-Speicherung und der Cholesterin-Abgabe aus peripheren Geweben hat dazu geführt, daß trotz Bemühungen um eine Therapie der Atherosklerose und insbesondere der durch Hyperlipidämie induzierten atherosklerotischen Veränderungen in den letzten zwanzig Jahren wenig Fortschritte erzielt worden sind, wenn man einmal von der Entwicklung des Cholesterin-Biosynthese-Hemmers Mevinolin (Mevinacor<sup>R</sup>) absieht, der in der Bundesrepublik kürzlich eingeführt wurde. So war man in der Vergangenheit im wesentlichen bestrebt, wirksamere und mit weniger Nebenwirkungen behaftete Fibrate und analoge Strukturen zu synthetisieren, auch ohne daß der exakte Wirkmechanismus von Clofibrat und anderer Fibrate bekannt war. Als Meßparameter wurde zumeist das gesamte Plasma-Cholesterin und später auch das LDL-Cholesterin benutzt, zur Prüfung wurden Standard-Tiermodelle herangezogen.

Fortschritte auf dem Gebiet der Prävention und der Therapie der Atherosklerose lassen sich jedoch nur erzielen, wenn unter Einbeziehung neuester wissenschaftlicher Erkenntnisse über den Stoffwechsel der Gefäßwandzellen, über Interaktionen zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen, über die Rolle der Makrophagen und der extrazellulären Matrix neue therapeutische Ansätze erarbeitet, Arbeitshypothesen erstellt und adäquate In-vitro- und In-vivo-Testmodelle entwickelt werden.

So basieren zahlreiche der im folgenden beschriebenen Modelle auf der Idee, über eine Stimulierung des "cholesterol efflux" eine Reduktion der Speicherung von Cholesterin in der Gefäß-

Daneben finden sich Modelle zur Auffindung von Verbindungen, die die Cholesterin-Biosynthese hemmen bzw. den LDL-Rezeptor aufwärts regulieren (wie Mevinolin) und von Probucol-ähnlichen Substanzen.



Bei Probucol handelt es sich um eine Substanz, die als Lipidsenker entwickelt und vermarktet worden ist, aber zusätzlich u.a. antioxidative Eigenschaften aufweist, und wegen der Wirksamkeit im Modell des "Watanabe-Kaninchens" die Hypothese erhärtete, daß an der Atherogenese oxidierte Lipide beteiligt sein könnten. Daneben aber gibt es Hinweise, daß Probucol auch den "reverse cholesterol transport" und den "cholesterol efflux" aus Makrophagen stimuliert, so daß nicht klar entschieden werden kann, welcher Mechanismus hauptsächlich für die antiatherosklerotische Wirksamkeit von Probucol verantwortlich ist. Zur Auffindung von Substanzen, die wie Probucol antioxidative Eigenschaften besitzen, wurden ebenfalls Screening-Modelle entwickelt.

## **4.2 Einbau von $^{14}\text{C}$ -Acetat in Cholesterin und Fettsäuren von kultivierten Hautfibroblasten**

### **4.2.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

In Gegenwart von  $^{14}\text{C}$ -Acetat synthetisieren kultivierte Fibroblasten radioaktiv markiertes Cholesterin und radioaktiv markierte Fettsäuren, die nach Extraktion und dünnschichtchromatographischer Trennung quantifiziert werden können (Methode nach Brown et al., 1981). Die Ergebnisse werden ausgedrückt in Pico- oder Nanomol Precursor, die von 1 mg Zellprotein in das jeweilige  $^{14}\text{C}$ -markierte Reaktionsprodukt inkorporiert werden. In Gegenwart von Cholesterinbiosynthese-hemmenden Substanzen wird vermindert  $^{14}\text{C}$ -Cholesterin synthetisiert.

Eine Aussage über den Angriffspunkt dieser Substanzen in die Cholesterinbiosynthese ist nicht möglich. Substanzen, die in diesem Testmodell wirksam sind, müssen zur Bestimmung des Angriffspunktes weiteren Untersuchungen unterzogen werden (z.B. Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, 4.3).

Ein erhöhtes Plasma-Cholesterin als wesentlicher Faktor bei der Genese der Atherosklerose kann durch Applikation von Cholesterinbiosynthese-Hemmern gesenkt werden.

### **4.2.2 Material und Methoden**

#### **4.2.2.1 Material**

##### **4.2.2.1.1 Zellen**

Es werden embryonale, menschliche Hautfibroblasten (Detroit 551) der American Type Culture Collection (ATCC Nr. CCL 110) verwendet. Die Zellen werden in 1 ml-Ampullen ( $1,1 \times 10^6$  Zellen) geliefert und befinden sich in der 11. Passage.



#### 4.2.2.1.2 Kulturmedium und Puffer

##### a) Kulturmedium

Für das Kulturmedium werden folgende Medien, Medienadditiva und Antibiotika benötigt:

1. Minimum Essential Medium, nach Dulbecco (DMEM, Boehringer Mannheim, Nr. 210048)
2. Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ , Merck, Nr. 6323)
3. Streptomycinsulfat (Serva, Nr. 35500)
4. Penicillin G-Kaliumsalz (Serva, Nr. 31749)
5. Fötales Kälberserum (FKS, Seromed, verschiedene Chargen)
6. nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA, 100fach konzentriert, Boehringer Mannheim, Nr. 210293)
7. Rinderserumalbumin (BSA, Sigma A7906)

DMEM-Pulverkonzentrat (für 5 l Medium)

- + 18,5 g  $\text{NaHCO}_3$
- + 1,0 g Streptomycinsulfat
- + 0,3 g Penicillin G (500.000 IU)

mit bidest. Wasser auf 5 l auffüllen und nach 15-30minütigem Rühren sterilfiltrieren (Filter 0,2  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schüll, Nr. 401352).

Die NEAA werden vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Das FKS wird zur Inaktivierung von Proteasen 2 Stunden bei 56 °C hitzeinaktiviert und vor Gebrauch 10 %ig (v/v) dem Flüssigmedium zugesetzt.

Als DMEM-Medium wird grundsätzlich das Nährmedium einschließlich  $\text{NaHCO}_3$ , NEAA und Antibiotika bezeichnet. Alle anderen Zusätze (FKS, "lipoprotein deficient serum" (LDS), BSA) werden gesondert aufgeführt.

#### 4.2.2.1.3 PBS-Puffer

Zum Waschen der Zellen wird "phosphate buffered saline" (PBS) verwendet:

- 8,0 g NaCl (Merck, Nr. 6404)
- 0,2 g KCl (Merck, Nr. 4936)
- 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, Nr. S0876)
- 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Nr. 4873)

werden mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt; der pH-Wert der Lösung ist 7,0.

#### 4.2.2.1.4 Reagenzien

##### a) Trypsinlösung

- 100 ml 0.25 % Trypsinlösung (Flow Nr. 1689454)
- + 7 ml 1 % EDTA in PBS

##### b) <sup>14</sup>C-Acetatlösung

- 1. 1 mCi Na-1-<sup>14</sup>C-Acetat (Amersham Buchler  
Code: CFA 13; 56 mCi/mmol)
- + 1 ml steriler PBS

- 2. 130 mg Na-Acetat
- + 10 ml steriler PBS

- 3. 90,63 ml DMEM
- + 9,00 ml LDS (50 mg/ml)
- + 0,27 ml Lösung 1 (0,4 mg)
- + 0,10 ml Lösung 2 (1,3 mg)

100 ml (0,2 mmol Acetat; in 100 ml sind 20,7 µmol enthalten)

- Radioaktivität messen (in 2 ml sind 0,4 µmol enthalten)
- spez. Aktivität berechnen: dpm/nmol Acetat

c)  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Lösung

- 1,2 (n)- $^3\text{H}$ -Cholesterin (Amersham Buchler Code: TRK 330)  
(0,5 mCi/ml Benzol)
- 125,0  $\mu\text{l}$  mit abs. Ethanol auf 25 ml auffüllen
  - 3 x 100  $\mu\text{l}$  Radioaktivitätsmessung
  - = ca.  $0,5 \times 10^6$  dpm/100  $\mu\text{l}$
  - Lösung vor dem Versuch dünnschichtchromatographisch  
(Petrolether/Diethylether/Eisessig 70/30/1) auf Rein-  
heit überprüfen

**4.2.2.2 Methoden**

**4.2.2.2.1 Trypsinieren der Zellen**

1. Medium absaugen
2. + 2 ml Trypsinlösung
3. ca. 5 min, 37 °C; unter dem Mikroskop den Ablösevor-  
gang verfolgen
4. Trypsinierte Zellen in ein Zentrifugenröhrchen pipet-  
tieren, in dem 2 ml DMEM/10 % FKS vorgelegt wurden
5. Zentrifugation bei 2.000 Upm, 1 min (Labofuge 6000,  
Heraeus)
6. Überstand absaugen, Pellet in 5 ml Medium suspendieren
7. Zentrifugation bei 2.000 Upm, 1 min
8. Überstand absaugen, Pellet in 5 ml Medium suspendie-  
ren, auf neue Petrischalen verteilen

**4.2.2.2.2 Einfrieren der Zellen**

- 1.- 7. wie Trypsinieren
8. Pellet suspendieren in 1 ml DMEM/10 % FKS/10 % DMSO,  
in Ampulle (NUNC, Best.-Nr. 363401) pipettieren
9. Mit Einfrierstopfen auf Position "G" 2 h im Stickstoff-  
behälter belassen, danach alle 15 min eine Position  
tiefer setzen

#### 4.2.2.2.3 Proteinbestimmung nach Lowry

##### Lösungen:

- Reagenz A: 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
0,1 mol/l NaOH
- Reagenz B: 1 % Kalium-Natrium-Tartrat  
0,5 %  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$   
einzeln lösen, dann zusammengeben
- Reagenz C: 50 Teile Reagenz A  
+ 1 Teil Reagenz B

Folin-Phenolreagenz von Merck.

2,5 % (w/w) Triton-X-100 in Aqua dest.

##### Prüflösung:

- 100  $\mu\text{l}$  Probe  
mit 2 ml Reagenz C gut mischen und 10 min stehen lassen.
- 100  $\mu\text{l}$  Folin-Reagenz (Merck, Nr. 9001) zugeben, gut mischen und 30 min stehen lassen.
- 100  $\mu\text{l}$  Triton-X-100 (2,5 % in aqua dest.) zugeben.
- Messen gegen Reagenz + Folin + Triton als Leerwert
- Wellenlänge: 660 nm

##### Eichlösung:

- 0,1 % BSA-Lsg.
- 10 - 50  $\mu\text{l}$  = 10 - 50  $\mu\text{g}$  BSA/Ansatz

#### 4.2.2.2.4 Auftauen und Kultivierung der Zellen

1. Ampulle aus Stickstoffbehälter entnehmen
2. 5 min, 37 °C, Wasserbad
3. Inhalt in Zentrifugenröhrchen überführen, mit 5 ml DMEM/10 % FKS verdünnen
4. Zentrifugation bei 2.000 Upm, 1 min
5. Überstand absaugen, + 5 ml DMEM/10 % FKS; Zellen vorsichtig mit Pasteurpipette suspendieren
6. Zentrifugation bei 2.000 Upm, 1 min
7. Überstand absaugen, Pellet mit 1 ml DMEM/10 % FKS versetzen, Zellen suspendieren, auf große Petrischalen ( $\phi$  10 cm; Nunc Nr. 150 350) mit 15 ml DMEM/10 % FKS geben
8. Medium nach 24 h wechseln

9. Brutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C
10. Konfluente Monolayer 1 : 20 auf Petrischalen splitten (φ 60 mm); Zelldichte: ca. 1 x 10<sup>5</sup> Zellen/dish + 3 ml DMEM/10 % FKS
11. Nach 3 Tagen Medium (DMEM/FKS) wechseln
12. Nach 3 Tagen Medium absaugen, mit 4 ml PBS waschen, + 2 ml DMEM/10 % LDS (Proteinkonzentration im Medium: 5 mg/ml) 24 h  
Medium absaugen

#### 4.2.2.2.5 Herstellung von Lipoprotein-freiem Serum (LDS)

1. Humanplasma der Blutbank  
Bestimmung von:
  - Gesamtcholesterin
  - Triglyceride
2. + 100 µg/ml Streptomycinsulfat  
+ 100 U/ml Penicillin G
3. Mit KBr auf  $\delta = 1,25$  g/ml einstellen
4. 1. Zentrifugation:
  - 24 h, 15 °C, 65.000 Upm, 70 Ti, Röhrchen 2,5 cm vom oberen Rand abschneiden
  - Unterphase erneut auf  $\delta = 1,25$  g/ml einstellen
  - 1/3 vol mit 2/3 KBr-Lsg. ( $\delta = 1,25$  g/ml, Streptomycin, Penicillin wie 2.) verdünnen
5. 2. Zentrifugation
  - 48 h, 15 °C, 40.000 Upm, 70 Ti, aufarbeiten wie 4.
6. Dialyse gegen:
  - 90,0 g 0,9 % NaCl
  - 12,1 g 0,01 mol/l Tris
  - 1,5 g Penicillin G
  - 1,0 g Streptomycinsulfat
  - ad 10 l H<sub>2</sub>O dest. pH 7,4
7. Dialyse 3 x wechseln
8. Evtl. Niederschlag abfiltrieren
9. Agaroseelektrophorese auf Fertigplatte, Lipid- und Proteinfärbung (0,05 mol/l Barbitalpuffer, pH 8,6; Fa. Corning)
10. Sterilfiltration (Filter: 0,45 µm, Schleicher & Schüll, Nr. 462100) in 30 ml-Portionen abfüllen und einfrieren
11. Proteinbestimmung nach Lowry

#### 4.2.2.2.6 Durchführung der Untersuchung

##### a) Aufarbeitung zur Bestimmung des Einbaus von $^{14}\text{C}$ -Acetat in Cholesterin

1. Jeder Petrischale 100  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Cholesterin zusetzen
2. Medium in 30 ml-Sovirellglas pipettieren
3. Zellmonolayer 2 x mit 2,0 ml PBS waschen, PBS zum Medium geben
4. Zellmonolayer  
+ 2,0 ml 0,1 mol/l NaOH; Zellrasen löst sich auf
5. 2 x 100  $\mu\text{l}$  zur Proteinbestimmung nach Bradford einsetzen (Bio Rad Nr. 5000001). Jede Probe vorher mit 100  $\mu\text{l}$  0,1 mol/l HCl neutralisieren
6. 1,6 ml Zellhydrolysat von 4.  
+ 4,8 ml Medium/PBS von 3  
+ 6,0 ml Ethanol  
+ 1,0 ml 50 % KOH/ $\text{H}_2\text{O}$   
in verschraubbares Sovirellglas pipettieren
7. Inkubation 1 h bei 75 °C
8. 3 x mit je 2 ml Petrolether extrahieren
9. Petroletherphase zusammenfassen, evtl. vorhandene  $\text{H}_2\text{O}$ -Phase (untere Phase) abnehmen, PE abblasen, mit ca. 800  $\mu\text{l}$  in Eppendorfgeläß überführen, abblasen  
+ 200  $\mu\text{l}$  PE = basischer Extrakt
10. Gesamtextrakt auf DC  
Laufmittel: Petrolether/Diethylether/Eisessig  
70:30:1 (v/v)  
eine Bahn scannen, Cholesterinbande in der Jodkammer markieren, Cholesterinbande auskratzen
11. Kieselgel der entsprechenden Cholesterinbanden  
+ 1 ml  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1; v/v) 1 h bei RT stehenlassen  
+ 10 ml Szintillator (Instagel II, Packard)  
Radioaktivitätsmessung

b) Aufarbeitung zur Bestimmung des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Acetat in Fettsäuren

1. Jeder Petrischale 100  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Fettsäure-Lösung zusetzen
2. Medium in 30 ml-Sovirellglas pipettieren
3. Zellmonolayer 2 x mit 2,0 ml PBS waschen, PBS zum Medium geben
4. Zellmonolayer  
+ 2,0 ml 0,1 mol/l NaOH; Zellrasen löst sich auf
5. 2 x 100  $\mu\text{l}$  zur Proteinbestimmung nach Bradford einsetzen (Bio Rad Nr. 5000001). Jede Probe vorher mit 100  $\mu\text{l}$  0,1 mol/l HCl neutralisieren
6. 1,6 ml Zellhydrolysat von 4.  
+ 4,8 ml Medium/PBS von 3.  
+ 6,0 ml Ethanol  
+ 1,0 ml 50 % KOH/H<sub>2</sub>O  
in verschraubbares Sovirellglas pipettieren
7. Inkubation 1 h bei 75 °C
8. Wasserphase mit 1,5 ml HCl konz. ansäuern, + Spatelspitze NaCl, 3 x mit 2 ml Petrolether extrahieren, Wasserphase verwerfen
9. Petroletherphase zusammenfassen, evtl. vorhandene H<sub>2</sub>O-Phase abnehmen,
10. Petrolether abblasen, mit ca. 800  $\mu\text{l}$  in Eppendorfgefäß überführen, abblasen + 200  $\mu\text{l}$  PE = saurer Extrakt
11. 100  $\mu\text{l}$  von 13. zur Radioaktivitätsmessung
12. DC von Stichproben  
Laufmittel: Petrolether/Diethylether/Eisessig  
70:30:1 (v/v) scannen
13. Kieselgel der ausgekratzten Banden:  
+ 1 ml CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (1:1; v/v), 1 h bei RT stehenlassen  
+ 10 ml Instagel II (Packard)

Der Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Acetat in Cholesterin und in Fettsäuren kann im selben Experiment bestimmt werden. Nach Verseifung und Extraktion mit Petrolether wird die verbleibende wässrige Unterphase angesäuert und die Fettsäure, wie ab Punkt 8. beschrieben, extrahiert und quantifiziert.

#### 4.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Eine repräsentative Auswahl von Ergebnissen ist in Tab. 4.1 niedergelegt. Diese Daten zeigen, daß nicht nur der Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Acetat in Cholesterin, sondern auch die Inkorporation der Radioaktivität in Fettsäuren bzw. Triglyceride und die Veränderung des Zellproteins - dieser Parameter korreliert zumeist mit der Zahl intakter Zellen - für die Interpretation der erzielten Ergebnisse herangezogen werden müssen, um echte Inhibitoren eines enzymatisch katalysierten Schrittes der Cholesterinbiosynthese von den Substanzen differenzieren zu können, die über Eingriffe in wesentliche Zellstoffwechselreaktionen auch die Cholesterinsynthese beeinflussen.

Im Rahmen des Substanzscreenings wurde von uns eine wenigstens 50 %ige Inhibition des Einbaus der Radioaktivität in Cholesterin als Kriterium für eine weitere Prüfung der jeweiligen Substanz festgelegt. Aus der Tab. 4.1 wird deutlich, daß zahlreiche der dort aufgeführten Substanzen dieses Kriterium erfüllen. Einige von Ihnen, so NAT 06-309, NAT 06-286, NAT 52-059 und besonders NAT 06-271, lassen eine deutliche Reduktion der Proteinsynthese und damit Zelltoxizität erkennen. Teilweise ist die Reduktion der Proteinsynthese gekoppelt an eine stimulierte Fettsäuresynthese, teilweise ist die Inkorporation der Radioaktivität in Fettsäuren auch ohne nennenswerten Einfluß auf das Zellprotein bzw. die Cholesterinsynthese stimuliert, so z.B. bei NAT 06-288.

Während es aus rein theoretische Erwägungen plausibel erscheint, daß bei Hemmung der Cholesterinbiosynthese ein größerer Anteil des angebotenen  $^{14}\text{C}$ -Acetats in Fettsäuren, Triglyceride oder Phospholipide eingebaut wird als bei einem Kontrollexperiment ohne Zusatz eines Inhibitors - Compactin führt bei mehr als 90 %iger Hemmung der Cholesterinbiosynthese zu einer etwa 40 %igen Erhöhung der in Fettsäuren eingebauten Radioaktivitätsmenge -, könnte eine 100 - 500 %ige Steigerung der Fettsäure-Radioaktivität mit einer Hemmung der mitochondrialen Prozesse des Citratzyklus bzw. der Atmungskettenphosphorylierung erklärt werden, so daß aus dem sich in den Mitochondrien anstauenden  $^{14}\text{C}$ -Acetat durch den Prozess der mitochondrialen Kettenverlängerung - als Umkehr der  $\beta$ -Oxidation -  $^{14}\text{C}$ -Fettsäuren synthetisiert werden; dieser Weg



Tab. 4.1: Der Einfluß von Compactin als Referenzsubstanz und von Substanzen, welche in unseren Laboratorien synthetisiert wurden, auf den zellulären Proteingehalt, die Inkorporationsrate von  $^{14}\text{C}$ -Acetat in Cholesterin und Fettsäuren in in vitro kultivierten Hautfibroblasten. Alle Experimente wurden nach Brown et al. (1978) durchgeführt. Humane Fibroblasten wurden als Monolayer kultiviert und zwischen der 5. und 20. Passage experimentell eingesetzt. Am Tag 7 wurde das Kulturmedium gegen 2 ml DMEM, welches 9 % humanes lipoproteinfreies Serum (LDS), 4  $\mu\text{mol/l}$   $^{14}\text{C}$ -Acetat und die aufgeführten Konzentrationen der Substanzen (vorgelöst in 10  $\mu\text{l}$  Ethanol) enthielt, gewechselt. Nach einer 24stündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen für die Bestimmung von Zellprotein,  $^{14}\text{C}$ -Cholesterin und  $^{14}\text{C}$ -Fettsäuren aufgearbeitet, wobei  $^3\text{H}$ -Cholesterin und  $^3\text{H}$ -Ölsäure als interne Standards zur Ausbeutebestimmung der Extraktionsschritte eingesetzt wurden. Die Ergebnisse sind tabellarisch dargestellt als prozentuale Änderung des jeweiligen Meßparameters im Vergleich zur Kontrolle. Es wurden Fünffach-Bestimmungen durchgeführt.

Substanz	Konz. [mol/l]	% Änderung		
		Protein	Cholesterin	Fettsäuren
Compactin	$3 \times 10^{-6}$	- 7,1	- 92,8	+ 41,2
(Referenz-Substanz)	$3 \times 10^{-6}$	- 7,3	- 91,8	+ 53,2
NAT 01-422	$10^{-4}$	- 5,4	- 75,7	+ 49,2
NAT 06-200	$10^{-4}$	- 27,2	- 83,8	+ 286,7
NAT 06-271	$10^{-4}$	- 91,6	+ 20,7	- 18,8
NAT 80-003	$10^{-4}$	- 28,3	- 27,3	+ 140,4
NAT 80-009	$10^{-4}$	- 1,3	- 75,9	- 26,2
NAT 52-059	$10^{-4}$	- 64,4	- 89,2	+ 132,8
NAT 06-267	$10^{-6}$	+ 14,8	- 78,6	+ 28,4
NAT 06-274	$10^{-4}$	+ 14,8	- 42,8	+ 52,2
NAT 06-282	$10^{-4}$	- 29,9	- 26,8	+ 155,0
NAT 06-282	$10^{-4}$	- 18,4	- 54,8	+ 281,0
NAT 06-285	$10^{-4}$	+ 1,6	- 84,1	+ 23,4
NAT 06-286	$10^{-4}$	- 43,9	- 84,1	+ 364,6
NAT 05-287	$10^{-6}$	+ 1,6	- 52,3	- 6,5
NAT 06-288	$10^{-6}$	- 14,8	$\pm 0$	+ 492,0
NAT 06-290	$10^{-4}$	- 12,0	- 19,0	+ 0,9
NAT 06-309	$10^{-4}$	- 64,3	- 88,6	- 86,0
NAT 06-315	$10^{-4}$	- 4,0	- 21,1	+ 110,3
NAT 06-319	$10^{-4}$	- 9,3	- 19,3	+ 55,0
NAT 03-373	$10^{-4}$	- 14,8	- 86,4	+ 229,0

wird z.B. in Hypoxie von glatten Muskelzellen des Arterien-  
gewebes verstärkt beschränkt. Die Klärung der Frage, ob in  
Gegenwart einiger der geprüften Substanzen über den Weg der  
mitochondrialen Kettenverlängerung Fettsäuren synthetisiert  
werden, setzt weitere Untersuchungen und eine genaue Analyse  
der gebildeten  $^{14}\text{C}$ -markierten Fettsäuren voraus. Verfolgungs-  
wert sind jedoch in ersten Linie Substanzen, deren Effekt im  
wesentlichen auf die Hemmung der Cholesterinbiosynthese  
beschränkt bleibt.

Das In-vitro-Modell "Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Acetat in Cholesterin und  
Fettsäuren kultivierter Hautfibroblasten" ist als Alternative  
zu dem In-vivo-Modell "Hemmung der Cholesterinbiosynthese  
in vivo" entwickelt worden, bei dem nach i.v.-Injektion von  
 $^{14}\text{C}$ -Acetat in Ratten die in das Plasma-Cholesterin inkorpo-  
rierte Radioaktivität gemessen wird.

Mit Ausnahme der Referenzsubstanzen Compactin und Mevinolin,  
die sowohl in vitro als auch in vivo wirksam waren, erwiesen  
sich einige in vivo als wirksam gefundenen Substanzen im  
In-vitro-Test als unwirksam. Diese fehlende Korrelation  
könnte in der Metabolisierung dieser Substanzen in vivo zu  
den eigentlichen Wirkstrukturen begründet sein. Nähere Unter-  
suchungen zeigten jedoch auch, daß durch diese Substanzen  
u.a. die Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Thymidin in die DNA einer per-  
manenten Tumorzelllinie inhibiert wird, so daß die in vivo  
festgestellte Reduktion der Radioaktivität des Plasma-Chole-  
sterins nicht in einer selektiven Hemmung der Cholesterinbio-  
synthese begründet sein dürfte.

Während der Laufzeit des Projektes wurde aus strategischen  
Gründen dieses Modell nicht mehr für das generelle Screening  
von Substanzen herangezogen, sondern nur noch für Substanzen  
eingesetzt, die eine gute Wirkung in den Testmodellen zur  
ACAT-Inhibition gezeigt hatten, um die Selektivität dieser  
ACAT-Inhibitoren zu bestimmen und um Substanzen zu finden,  
die neben dem Einfluß auf die ACAT auch die Cholesterinbio-  
synthese inhibierten. Einige repräsentative Ergebnisse sind  
in Tab. 4.2 zusammengefaßt.

Bei einigen Substanzen konnte eine Tendenz zur Zunahme des  
Zellproteins festgestellt werden. Geht diese im Vergleich zur

Kontrolle einher mit einer Abnahme der prozentualen Fettsäuresyntheserate, kann nicht geschlossen werden, daß die Substanzen einen direkten inhibitorischen Effekt auf die Fettsäuresynthese aufweisen, da letztere immer auf die Zellproteinmenge bezogen wird. Umgekehrt bedeutet eine Zunahme der prozentualen Fettsäuresyntheserate bei reduzierter Proteinmenge und gehemmter Cholesterinbiosynthese nicht zwangsläufig einen "shift" zugunsten der Fettsäuresynthese.

Die drastische Abnahme der Inkorporation von  $^{14}\text{C}$ -Acetat in Cholesterin bei nur geringer Beeinflussung des Zellproteins und der Fettsäuresyntheserate in Anwesenheit von NAT 06-611 und NAT 04-550 läßt auf eine spezifische Hemmung der Cholesterinbiosynthese und eine gewisse Selektivität beider Substanzen schließen. Prüft man jedoch den Einfluß der beiden zuletzt genannten Substanzen auf den Einbau von  $^3\text{H}$ -Methionin in das Zellprotein der Hepatoma-Zelllinie HepG2, die für die Bestimmung der Zytotoxizität von Prüfsubstanzen herangezogen wird, so stellt man eine deutliche Beeinflussung der Proteinbiosynthese bei diesen Zellen fest. Möglicherweise lassen sich solche Effekte bei Verwendung von Hautfibroblasten nicht so klar nachweisen, da sich diese Zellen normalerweise unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht mehr vollständig in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. So kann also ein zytotoxischer Einfluß als Ursache für die Reduktion der Cholesterinbiosynthese nicht ausgeschlossen werden.

Die angeführten Beispiele und die Diskussion belegen, daß sich dieses Testmodell sehr wohl für die Auffindung von Substanzen eignet, die die Cholesterinbiosynthese hemmen, daß aber weitere Parameter und auch weitere Untersuchungen notwendig sind, um eine Selektivität dieses Effektes zu belegen und damit die Chance der Entwicklung zu einem potentiellen Pharmakon zu eröffnen.

Tab. 4.2: Der Einfluß der Referenzsubstanz Compactin und von Substanzen, welche in unseren Laboratorien synthetisiert wurden, auf den zellulären Proteingehalt, die Inkorporationsrate von  $^{14}\text{C}$ -Acetat in Cholesterin und Fettsäuren in in vitro kultivierten Hautfibroblasten. Alle Experimente wurden nach Brown et al. (1978) durchgeführt. Humane Fibroblasten wurden als Monolayer kultiviert und zwischen der 5. und 20. Passage experimentell eingesetzt. Am Tag 7 wurde das Kulturmedium gewechselt gegen 2 ml DMEM, welches 9 % humanes Lipoprotein-freies Serum (LDS),  $4 \mu\text{mol/l}$   $^{14}\text{C}$ -Acetat und die aufgeführten Konzentrationen der Substanzen (vorgelöst in  $10 \mu\text{l}$  Ethanol) enthielt. Nach einer 24stündigen Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die Zellen für die Bestimmung von Zellprotein,  $^{14}\text{C}$ -Cholesterin und  $^{14}\text{C}$ -Fettsäuren aufgearbeitet, wobei  $^3\text{H}$ -Cholesterin und  $^3\text{H}$ -Ölsäure als interne Standards zur Ausbeutebestimmung der Extraktionsschritte eingesetzt wurden. Die Ergebnisse sind tabellarisch dargestellt als prozentuale Änderung des Meßparameters im Vergleich zur Kontrolle. Es wurden Fünffach-Bestimmungen durchgeführt.

Substanz	Konz. [mol/l]	% Änderung		
		Protein	Cholesterin	Fettsäuren
Compactin (Referenz-Substanz)	$10^{-7}$	+ 6	- 83	+ 14
	$10^{-7}$	- 3	- 81	+ 90
NAT 04-536	$10^{-5}$	+ 18	- 98	- 31
	$5,6 \times 10^{-5}$	- 6	- 97	+ 26
NAT 04-538	$10^{-5}$	+ 18	- 82	- 4,5
	$5,6 \times 10^{-5}$	+ 51	- 96	+ 31,6
NAT 04-544	$10^{-5}$	+ 58	- 98	- 40,6
	$5,6 \times 10^{-5}$	- 30	- 95	+ 72,1
NAT 04-547	$10^{-5}$	+ 13	- 83	- 29,4
	$5,6 \times 10^{-5}$	- 37	- 87	+ 142,2
NAT 04-555	$10^{-5}$	+ 55	- 5,8	- 40,5
	$5,6 \times 10^{-5}$	+ 72	- 42	- 33,8
NAT 04-537	$10^{-5}$	- 6	+ 10	+ 40
	$5,6 \times 10^{-5}$	- 14	- 49	+ 56
NAT 04-558	$10^{-5}$	+ 8	- 78	+ 32
	$5,6 \times 10^{-5}$	-	-	-
NAT 04-543	$10^{-5}$	- 8	- 8	- 20
	$5,6 \times 10^{-5}$	+ 28	- 38	- 36

Fortsetzung Tab. 4.2

Substanz	Konz. [mol/l]	% Änderung		
		Protein	Cholesterin	Fett- säuren
NAT 04-533	$3 \times 10^{-6}$	$\pm 0$	- 10	+ 23
	$10^{-5}$	- 6	+ 15	+ 26
NAT 04-550	$3 \times 10^{-6}$	- 9	- 75	+ 36
	$10^{-5}$	- 14	- 96	+ 17
NAT 04-556	$3 \times 10^{-6}$	+ 15	+ 9	+ 15
	$10^{-5}$	+ 25	+ 3	+ 9
NAT 04-611	$3 \times 10^{-6}$	- 20	- 93	+ 17
	$10^{-5}$	- 27	- 97	+ 13
NAT 06-209	$3 \times 10^{-6}$	- 10	$\pm 0$	- 10
	$10^{-5}$	- 10	+ 12	+ 25
NAT 06-210	$3 \times 10^{-6}$	- 10	+ 12	- 1
	$10^{-5}$	- 13	+ 7	- 1

### **4.3 Hemmung der HMG-CoA-Reduktase**

#### **4.3.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

In Gegenwart von NADPH katalysiert die  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) im Rahmen der Cholesterinbiosynthese die Reduktion von  $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA zu  $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäure, die sich nach Überführung in das  $^{14}\text{C}$ -Mevalonolaktone dünnschichtchromatographisch von dem nicht umgesetzten  $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA abtrennen und durch Radioaktivitätsmessung quantifizieren läßt. In Gegenwart von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren ist die Bildungsgeschwindigkeit von  $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäure herabgesetzt. Als Enzymquelle für diese Reaktion lassen sich Homogenate Cholesterin-synthetisierender Zellen (z.B. Makrophagen, Hepatozyten) oder mikrosomale Membranen aus Rattenleber verwenden.

Dieses Testsystem bietet sich als ein dem  $^{14}\text{C}$ -Acetat-Einbau in Fibroblasten (siehe 4.2) nachgeschalteter Test an, um dort gefundene potentielle Inhibitoren der Inkorporation von Acetat in Cholesterin dahingehend zu prüfen, ob sie eine direkte Hemmung des Schlüsselenzyms der Cholesterinbiosynthese verursachen oder einen anderen Angriffspunkt haben.

HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren setzen die Cholesterin-Syntheserate herab, erhöhen die Dichte von LDL-Rezeptoren an Zellmembranen (Makrophagen, Hepatozyten), senken die LDL-Plasmakonzentration und können auf diese Weise antiatherosklerotisch wirken.

#### **4.3.2 Material und Methoden**

##### **4.3.2.1 Material**

###### **4.3.2.1.1 Versuchstiere**

Für die Präparation mikrosomaler Membranen werden die Lebern von männlichen Wistar-Ratten (Züchter: Fa. Hagemann, Extertal) verwendet. Die Tiere werden in Makrolonkäfigen unter standardisierten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), Hell-Dunkel-Rhythmus 12 h). Die Tiere erhalten Standardfutter (Altromin, Lage) bzw. Cholesterin-reiches Fut-

ter (1,5 %, 0,5 % Natriumcholat) und Trinkwasser ad libitum.  
Vor Entnahme der Lebern wiegen die Tiere ca. 200 g.

#### **4.3.2.1.2 Puffer**

a) Homogenisationspuffer

50 mmol/l Tris/HCl

0,25 mol/l Saccharose, pH 7,4

b) Testpuffer

100 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$

5 mmol/l Dithiothreitol, pH 7,4

#### **4.3.2.1.3 Reagenzien**

a) Kofaktorenlösung

Jeweils 10  $\mu\text{l}$  der folgenden Reagenzien werden pro Testansatz vor Versuchsbeginn gemischt:

100 mmol/l NADP (Na-Salz, Sigma)

0,6 mol/l D-Glucose-6-phosphat (Na-Salz, Sigma)

100 U/ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Typ XV, Sigma)

b)  $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA-Lösung

Pro Testansatz werden 10  $\mu\text{l}$   $^{14}\text{C}$ -Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (7,4 kBq; spez. Akt. 2,1 GBq/mmol; NEN, Dreieich) mit 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gemischt

c)  $^3\text{H}$ -Mevalonolacton

(spez. Akt. 1,11 TBq/mmol; NEN, Dreieich)

#### **4.3.2.2 Methoden**

##### **4.3.2.2.1 Präparation von mikrosomalen Membranen**

a) Homogenisierung

Die Lebern von Ratten (Wistar, männlich) werden sofort nach der Dekapitation entnommen, in eiskaltem Homogenisationspuffer gewaschen, zerkleinert und im Eisbad in einem elektrischen Potter-Homogenisator (Braun, Melsungen) bei 1.100 U/min homogenisiert (10 % Leberhomogenat).

#### *b) Zentrifugationen*

Alle Zentrifugationen werden bei 4 °C durchgeführt. Das Leberhomogenat wird zur Beseitigung von Zellbruchstücken 10 min bei 800 x g zentrifugiert, der Überstand filtriert und 15 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand nochmals für 15 min bei 16.000 x g zentrifugiert.

Die oberen zwei Drittel des 16.000 x g-Überstandes werden vorsichtig entnommen und in einer Ultrazentrifuge 60 min bei 100.000 x g zentrifugiert. Das Pellet (mikrosomale Membranen) wird im Homogenisationspuffer resuspendiert und erneut 60 min bei 100.000 x g zentrifugiert. Das mikrosomale Pellet wird nach Resuspension und Einstellen einer definierten Proteinkonzentration (100-150 µg/50 µl) im Testpuffer aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### *4.3.2.2 Durchführung der Untersuchung*

Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in mikrosomalen Membranen der Rattenleber wird durch Bestimmung der Bildung von  $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäure aus  $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA ermittelt.

50 µl mikrosomale Membranen (100 µg Protein) werden mit 30 µl Kofaktorenlösung für 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Testpuffer, der die Prüfsubstanz enthält, und weiterer Vorinkubation für 10 min wird die Reaktion mit 20 µl  $^{14}\text{C}$ -Oleoyl-CoA (7,4 kBq; spez. Akt. 2,1 GBq/mmol, NEN) gestartet. Nach Inkubation für 20 min bei 37 °C wird die Inkubation mit 50 µl HCl (6 mol/l) und  $^3\text{H}$ -Mevalonolakton als interner Standard (1,7 kBq/50 µl HCl) gestoppt. Durch Zugabe von HCl wird eine Laktonisierung der gebildeten  $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäure erreicht. Diese Laktonisierung ist nach 30 min bei Raumtemperatur abgeschlossen.

Nach Zugabe von 400 µl gesättigter  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Lösung und Inkubation für maximal 5 min bei Raumtemperatur wird das  $^{14}\text{C}$ -Mevalonolakton anschließend mit 2 x 2,5 ml Essigsäureethylester extrahiert, 5 min bei ca. 2.000 U/min zentrifugiert und die Essigesterphasen (obere Phase) möglichst quantitativ abgenommen. Diese werden vereinigt und anschließend in einem Spitzröhrchen mit im Stickstoffgasstrom bis zur Trockne abgebla-



sen. Die Radioaktivität wird direkt nach Aufnahme in 50 µl Essigsäureethylester und Zugabe von 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Instagel II, Fa. Packard) in einem Szintillationszähler (Rackbeta 1219, LKB-Wallac) gemessen.

Die Zugabe von gesättigter  $K_2HPO_4$ -Lösung bewirkt eine maximale Trennung von  $^{14}C$ -Mevalonolakton und nicht umgesetzten  $^{14}C$ -HMG-CoA, so daß unter den angegebenen Extraktionsbedingungen fast keine Verunreinigung (< 0,5 %) der Essigsäureethylesterphase mit  $^{14}C$ -HMG-CoA festgestellt wurde.

Eine chromatographische Auftrennung ist daher nicht zwangsläufig notwendig. Diese kann jedoch gelegentlich zur Überprüfung der Testsystems durchgeführt werden. Zu diesem Zwecke wird die Essigsäureethylesterphase auf Dünnschichtplatten (Kieselgel LK5D Linear-K, 20 x 20 cm, Fa. Whatman) aufgetrennt und  $^{14}C$ -Mevalonolakton mittels einer Beta-Kamera (LB 292, Fa. Berthold) lokalisiert, in Szintillationsgefäße überführt und die Radioaktivität wie oben angegeben bestimmt.

#### *4.3.3 Ergebnisse und Diskussion*

Routinemäßig werden als Enzymquelle mikrosomale Membranen aus Rattenleber verwendet.

Alle Reaktionsansätze werden in Anwesenheit von 0,1 % PPC (Polyenyl-Phosphatidylcholin) inkubiert, wodurch eine Stabilisierung des Testsystems und eine optimale Suspendierung wasserunlöslicher, in einem organischen Lösungsmittel vorge löster Substanzen gewährleistet wird. Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase wird nicht beeinflusst.

Erste Untersuchungen hatten das Ziel, die verwendete HMG-CoA-Reduktase näher zu charakterisieren und die Bedingungen für Inkubation, Extraktion und Chromatographie zu optimieren.

Nach Beendigung der Inkubation wird die enzymatische Umsetzung von HMG-CoA durch Ansäuern des Reaktionsansatzes gestoppt und damit die Bildung von Mevalonolakton aus Mevalonsäure ermöglicht. Abbildung 4.4 zeigt, daß nach etwa 30 min nahezu die gesamte gebildete Mevalonsäure in Mevalonolakton überführt worden ist. Verkürzt man diese Wartezeit vor der Chromatographie, so wird aufgrund unvollständiger Lakto-

nisierung eine geringere Enzymaktivität vorgetäuscht. In dem untersuchten Inkubationszeitraum von 30 min besteht eine lineare Abhängigkeit der Menge des gebildeten Reaktionsproduktes von der Inkubationszeit (Abb. 4.5).

Um die verwendete HMG-CoA-Reduktase näher zu charakterisieren, wurden die Michaelis-Konstanten ( $K_M$ ) für NADPH und HMG-CoA graphisch nach Lineweaver-Burk bestimmt (Abb. 4.6). Für HMG-CoA und NADPH konnten  $K_M$ -Werte von 8,3  $\mu\text{mol/l}$  bzw. 53  $\mu\text{mol/l}$  ermittelt werden. Diese Werte stimmen gut überein mit den Michaelis-Konstanten, die von anderen Autoren für Rattenleber-HMG-CoA-Reduktase ermittelt wurden (0,5-2,6  $\mu\text{mol/l}$  für HMG-CoA und 30 - 73  $\mu\text{mol/l}$  für NADPH).

Mevinolin als bekannter Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase hemmt das Enzym bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  zu mehr als 50 %. Die Untersuchung des Hemmtyps zeigt, daß der  $K_M$ -Wert für HMG-CoA mit zunehmender Inhibitor-Konzentration scheinbar erhöht wird, während die Maximalgeschwindigkeit unverändert ist (Abb. 4.7). Bei Mevinolin handelt es sich somit um einen kompetitiven Inhibitor, für den nach Dixon eine Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von  $4,63 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$  ermittelt wurde.

Um auch nicht-wasserlösliche potentielle Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase untersuchen zu können, wurde der Einfluß verschiedener Lösungsvermittler auf die Enzymaktivität untersucht. Tabelle 4.3 zeigt die prozentuale Veränderung der Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in Abhängigkeit von der Konzentration der verwendeten organischen Lösungsmittel im Reaktionsansatz. Alle geprüften Lösungsmittel können bis zu einer Konzentration von 2 % ohne nennenswerten Aktivitätsverlust des Enzyms eingesetzt werden; während 5 % Methanol bzw. DMSO eine relativ deutliche Hemmung des Enzyms verursachen, hat Ethanol in dieser Konzentration nur einen geringfügigen Einfluß auf die Enzymaktivität, wogegen DMF mit zunehmender Konzentration das Enzym eher zu stimulieren scheint.

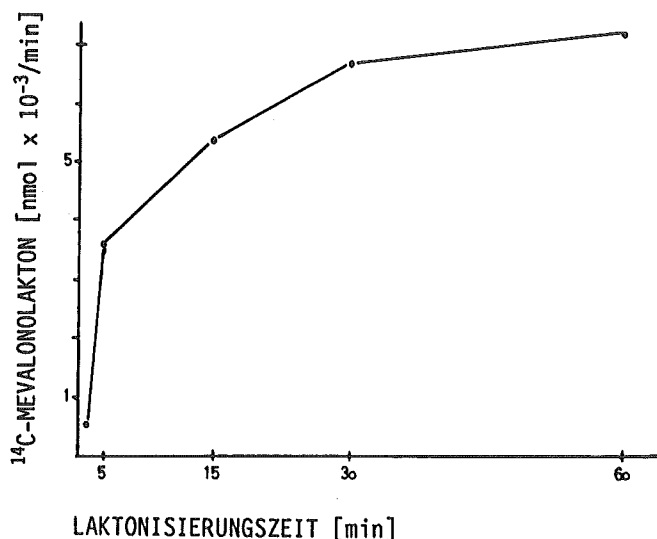


Abb. 4.4: Die Bildung von <sup>14</sup>C-Mevalonolakton in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

150 µg mikrosomaler Proteine wurden bei 37 °C für 10 min mit 150 µl eines Puffers (pH 7,2), welcher 50 mmol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mmol/l KCl, 5 mmol/l DTT, 30 mmol/l EDTA, 0,1 mol/l Saccharose und 0,1 % PPC enthielt, vorinkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl <sup>14</sup>C-HMG-CoA (0,1 µCi; spez. Akt.: 56,7 mCi/mmol) und eines NADPH-generierenden Systems (30 µl; 5 mmol/l NADP, 30 mmol/l Glukose-6-Phosphat, 2,5 U Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, jeweils Endkonzentration) gestartet. Die Proben wurden 20 Min. bei 37 °C inkubiert und die Reaktion mit 50 µl einer 6 mol/l HCl-Lösung beendet. Zu den angegebenen Laktonisierungszeiten wurden jeweils 400 µl einer K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung und 30 µl <sup>3</sup>H-Mevalonolakton (0,05 mCi) als interner Standard zugesetzt, und die Lösung zweimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die Extrakte wurden nach Zentrifugation vereinigt, bei 30 °C unter Stickstoffgasstrom getrocknet und nach Lösung in 50 µl Essigsäureethylester auf Kieselgelplatten (Whatman LK5D) mit Toluol/Aceton (1:1; v/v) als mobile Phase dünn-schichtchromatographisch getrennt. Die radioaktiv markierten Flecke wurden mittels Radiophotographie auf der Dünnschichtplatte detektiert und die Bereiche, welche <sup>14</sup>C-Mevalonolakton entsprachen, ausgekratzt. Die <sup>14</sup>C- und <sup>3</sup>H-Radioaktivität wurde nach Zugabe eines Szintillators (Instagel II, Fa. Packard) in einem Flüssigszintillationszähler quantifiziert.

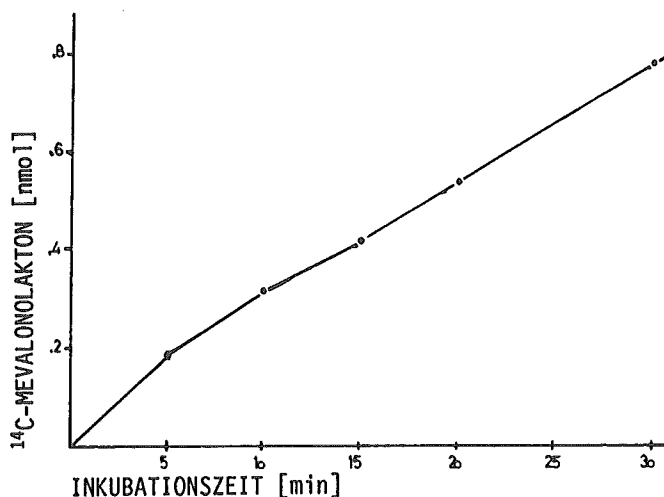


Abb. 4.5: Einfluß der Inkubationszeit auf die Bildung von <sup>14</sup>C-Mevalonsäure.

Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zu Abb. 4.4 beschrieben, durchgeführt. Die Reaktionen wurden zu den angegebenen Zeiten gestoppt. Die Laktonisierungszeit wurde mit 30 min konstant gehalten.

In diesem Testmodell wurden nicht nur Substanzgemische aus Pflanzenzellkulturen geprüft, sondern auch diejenigen Substanzen, die eine Reduktion des Einbaus von <sup>14</sup>C-Acetat in Cholesterin von Hautfibroblasten (Kap. 4.2) verursacht hatten. Keine der geprüften Substanzen erwies sich als Inhibitor der HMG-CoA Reduktase. Dies deutet darauf hin, daß diese Substanzen einen anderen Angriffspunkt in der Cholesterinbiosynthese haben oder die Ursache der Verminderung der Cholesterinsynthese in einer zytotoxischen Wirkung zu suchen ist. Auch in den Extrakten aus Pflanzenzellkulturen konnte keine nennenswerte inhibitorische Aktivität gefunden werden.

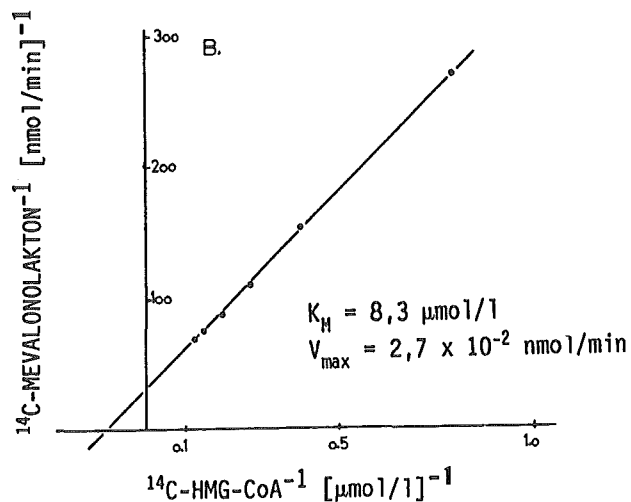
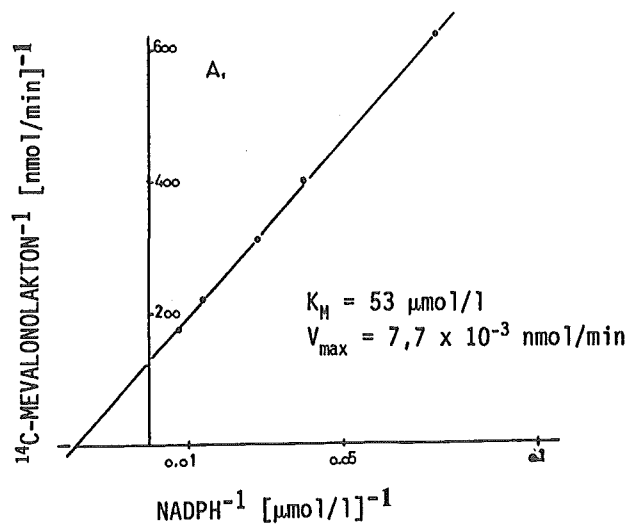


Abb. 4.6: Doppelt-reziproke Auftragung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration zur Bestimmung der Michaeliskonstanten.

Die Experimente wurden unter Standardbedingungen (Laktonisierungszeit: 30 min) durchgeführt; variiert wurden nur die Konzentrationen von NADPH (A) bzw. HMG-CoA (B) wie angegeben.

**Tab. 4.3: Einfluß von Lösungsmitteln auf die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität.**

*Die Experimente wurden unter Standardbedingungen (Laktonisierungszeit: 30 min), wie in der Legende zu Abb. 4.4 beschrieben, durchgeführt. Die Lösungsmittel wurden der Vorinkubationslösung zugesetzt, wobei die angegebene Konzentration diejenige im Endansatz ist. Das Ergebnis der Kontrollinkubation ohne Lösungsmittelzusatz wurde als 100% definiert.*

Lösungsmittel	Lösungsmittel-Konzentration [%]		
	1	2	5
	% Enzym-Aktivität		
Ethanol	105	103	96
Methanol	100	94	84
DMSO	92	91	79
DMF	109	111	130

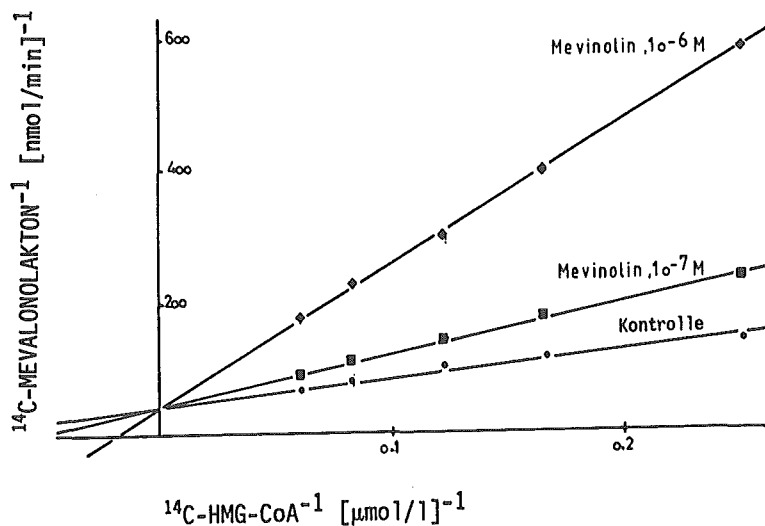


Abb. 4.7: Doppelt-reziproke Auftragung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substanzkonzentration in Anwesenheit bzw. in Abwesenheit des Inhibitors Mevinolin.

Die Experimente wurden unter Standardbedingungen (Laktonisierungszeit: 30 min), wie in der Legende zu Abb. 4.4 beschrieben, mit den angegebenen HMG-CoA-Konzentrationen durchgeführt. Mevinolin wurde bei der Vorinkubation als ethanolische Lösung zugesetzt; die Endkonzentration betrug dabei 2 Vol%. Kontroll-experimente wurden in Gegenwart von 2 % Ethanol ohne Inhibitor durchgeführt.

#### **4.4 Cholesterin-Einschleusung und Cholesterin-Veresterung in Makrophagen**

##### **4.4.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Bei Inkubation in Gegenwart von chemisch modifizierten Low-density-Lipoproteinen (z.B. Acetyl-LDL, Cyclohexandion-modifizierte LDL, Malondialdehyd-modifizierte LDL) akkumulieren Maus-Peritonealmakrophagen große Mengen an Cholesterinester, die sich zusammen mit dem nicht veresterten Cholesterin extrahieren und nach dünnsschichtchromatographischer Trennung densitometrisch quantifizieren lassen.

In Gegenwart von Prüfsubstanzen kann die Cholesterin-Einschleusung in die Makrophagen durch Hemmung der Aufnahme der LDL reduziert und/oder die Relation Cholesterin/Cholesterinester zugunsten des nicht veresterten Cholesterins verschoben sein. Letzteres wird möglich entweder durch Hemmung des Cholesterin-veresternden Enzyms (Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT)) oder durch Aktivierung des Cholesterinester-hydrolysierenden Enzyms (Cholesterinesterase).

Fügt man dem Inkubationsmedium während der letzten Phase der Inkubation  $^{14}\text{C}$ -Oleat hinzu, so kann neben der Quantifizierung von Cholesterin und Cholesterinester über eine Massenbestimmung auch die Inkorporation der Radioaktivität in Cholesterin- $^{14}\text{C}$ -Oleat bestimmt werden. Diese ist ein Maß für die Aktivität des Cholesterin-veresternden Enzyms, der ACAT.

Hemmer der Aufnahme der LDL oder der Veresterung des Cholesterins können antiatherosklerotische Therapeutika darstellen, weil sie die Bildung von sogenannten "Schaumzellen" verhindern, wobei ACAT-Inhibitoren oder Cholesterinesterase-Aktivatoren die Ausschleusung des Cholesterins aus den Zellen (z.B. mit Hilfe von High-density-Lipoproteinen, HDL) durch Bereitstellung einer größeren Menge unveresterten Cholesterins erleichtern.



#### *4.4.2 Material und Methoden*

##### *4.4.2.1 Material*

###### *4.4.2.1.1 Zellen*

Es wurden folgende makrophagenähnliche Zelllinien der Maus von "American Type Culture Collection" (ATCC) verwendet:

IC-21            ATCC Nr. TIB 186  
J774.A1 ATCC Nr. TIB 67  
PU5-1R ATCC Nr. TIB 61  
RAW264.7      ATCC Nr. TIB 71

Die makrophagenähnliche Zelllinie der Maus P388D<sub>1</sub> wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. G. Schmitz, Zentrallaboratorium der Universität Münster, zur Verfügung gestellt. Darüberhinaus fanden frisch angelegte Primärkulturen von Maus-Peritonealmakrophagen Verwendung.

###### *4.4.2.1.2 Kulturmedium und Puffer*

###### *a) Kulturmedium*

Für das Kulturmedium werden folgende Medien, Medienadditiva und Antibiotika benötigt:

1. Minimum Essential Medium, nach Dulbecco (DMEM, Boehringer Mannheim Nr. 210048)
2. Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>, Merck Nr. 6323)
3. Streptomycinsulfat (Serva, Nr. 35500)
4. Penicillin G-Kaliumsalz (Serva, Nr. 31749)
5. Fötale Kälberserum (FKS, Seromed, verschiedene Chargen)
6. Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA, 100fach konzentriert, Boehringer Mannheim, Nr. 210293)
7. Rinderserumalbumin (BSA, Sigma A7906)

DMEM Pulverkonzentrat (für 5 l Medium)

- + 18,5 g NaHCO<sub>3</sub>
- + 0,5 g Streptomycinsulfat
- + 0,3 g Penicillin G (500.000 IU)

werden mit bidestilliertem Wasser auf 5 l aufgefüllt und nach 15-30minütigem Rühren sterilfiltriert (Filter 0,2 µm, Schleicher & Schüll, Nr. 401352).

Die NEAA werden vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Das FKS wird zur Inaktivierung von Proteasen zwei Stunden bei 56 °C hitzeinaktiviert und vor Gebrauch 10 %ig (v/v) dem Flüssigmedium zugesetzt.

BSA wird als sterile 10 %ige Stammlösung in bidestilliertem Wasser bei 4 °C gelagert und dem Flüssigmedium vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Als DMEM-Medium wird grundsätzlich das Nährmedium einschließlich  $\text{NaHCO}_3$ , NEAA und Antibiotika bezeichnet. Alle anderen Zusätze (FKS, BSA) werden gesondert aufgeführt.

*b) PBS-Puffer*

Zum Waschen der Zellen wird "phosphate buffered saline" (PBS) verwendet:

8,0 g NaCl	(Merck, Nr.6404)
0,2 g KCl	(Merck, Nr. 4936)
1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	(Sigma, Nr. S0876)
0,2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$	(Merck, Nr. 4873)

werden mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt; der pH-Wert der Lösung beträgt 7,0.

**4.4.2.1.3 Reagenzien**

*a)  $^{14}\text{C}$ -Oleat-Komplex*

- 0,9 % NaCl-Lsg. auf 60 °C erhitzen
- in 3 ml dieser Lsg. 38,7 mg Na-Oleat lösen, abkühlen lassen auf 40 °C
- 1,2 g BSA in 5 ml 0,9 % NaCl (RT) lösen, auf pH 7,4 einstellen und auf 4 °C abkühlen
- die eiskalte BSA-Lsg. tropfenweise der Oleat-Lsg. zusetzen - pro MS-Einheit 5  $\mu\text{l}$   $^{14}\text{C}$ -Ölsäure (50  $\mu\text{Ci}/500 \mu\text{l}$  Ethanol) einsetzen
- Ethanol abblasen
- $^{14}\text{C}$ -Ölsäure in 15,7  $\mu\text{l}$  Albumin-Na-Oleat-Komplex/MS-Einheit aufnehmen und gut mischen

*b) Tauchbad für HPTLC*

3,2 g  $\text{MnCl}_2$   
480 ml Methanol  
480 ml Aqua dest.  
32 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  konz.

-----  
100 ml / Tauchgefäß werden eingesetzt

**4.4.2.2 Methoden**

**4.4.2.2.1 Isolierung von Peritonealmakrophagen der Maus**

Für die Isolierung von Peritonealmakrophagen zur Herstellung von Primärkulturen werden NMRI-Mäuse (männlich, ca. 20 g; Züchter Hagemann) verwendet.

Nach dem Töten der Maus in Etherdampf wird diese mit ausgestreckten Extremitäten auf einer Unterlage befestigt. Die Bauchhaut wird mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und anschließend vom Brust- bis zum Bauchraum abpräpariert, ohne die darunterliegende Muskulatur zu verletzen. In den inneren Bauchraum werden 4 ml 0,9 %ige NaCl + 0,5 E Liquemin (Hoffmann LaRoche) steril injiziert, ohne Organe zu verletzen. Der Bauchraum wird massiert, dann die Muskelschicht abgehoben, etwas eingeschnitten und die NaCl-Lsg. mit den Zellen mit einer sterilen Pasteurpipette aufgesogen und in ein steriles Röhrchen überführt.

Die Peritonealspülungen von 3 Mäusen werden in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt, 5 min bei 2.000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen werden in DMEM (10 % FKS) resuspendiert (1 ml Medium/Röhrchen) und auf die entsprechenden Multischalen verteilt. Es werden jeweils die Zellen von 2 Mäusen auf einer Multischaleneinheit zusammengefaßt (Konzentration der Zellen ca.  $5-7 \times 10^6$  Zellen).

**4.4.2.2.2 Präparation von humanen Low-Density-Lipoproteinen (LDL)**

Human-Vollblut der Blutbank Köln (Antikoagulan: Citrat) wird in einer Laborzentrifuge (Labofuge 6000, Heraeus) 15 min bei 3.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand (Citrat-Plasma) wird

mit Kaliumbromid (KBr, Merck, Nr. 4905) auf eine Dichte von 1,02 g/ml eingestellt und wie folgt zentrifugiert: Ultrazentrifuge L8-70M und 70Ti-Rotor, Quickseal-Röhrchen, Fa. Beckman, 16 h, 65.000 Upm, 4 °C.

Es werden 10 ml Überstand (VLDL, Chylomikronen) mittels Pasteurpipette abgenommen und verworfen.

Die untere Phase wird mit KBr auf eine Dichte von 1,063 g/ml eingestellt und erneut unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Die oberen 5-8 ml - je nach LDL-Gehalt des Plasmas - werden mittels Pasteurpipette abgenommen und gegen folgenden Puffer dialysiert:

36,0 g Natriumchlorid (NaCl, Merck Nr. 6404)  
1,5 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Sigma,  
Nr. ED2SS)  
1,2 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Sigma  
Nr. S0876)

werden mit vorgekühltem (4 °C) bidest. Wasser auf 4 l aufgefüllt (pH 7,2). Der Dialysepuffer wird jeweils frisch angesetzt, wobei für 100 ml LDL-Präparation sechsmal 4 l Dialysepuffer eingesetzt werden; die Dialyse erfolgt über insgesamt 24 h. Es wird ein Dialyseschlauch mit einer Ausschlußgrenze von 10.000 g/mol eingesetzt (Serva, Nr.44110).

Nach einer Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) wird das LDL sterilfiltriert (Einwegfilterhalter, Sartorius, Nr. 16534 K); die maximale Haltbarkeit beträgt 4 Wochen.

#### *4.4.2.2.3 Herstellung von acetyliertem LDL*

1 ml LDL-Lösung (10-16 mg Protein/ml) und 1 ml gesättigte Natriumacetatlösung werden im Eisbad gerührt. Es ist darauf zu achten, daß die gesamte Lösung ständig in Bewegung ist.

Man läßt Acetanhydrid langsam (etwa 3 µl/5 min) zutropfen, wobei die benötigte Menge nach folgender Regel ermittelt wird: mg LDL-Protein x 1,5 = µl Acetanhydrid.

Nach Zugabe des gesamten Acetanhydrids wird die gesamte Lösung noch weitere 30 min gerührt.

Über Nacht wird gegen

0,9 % NaCl

0,3 mmol/l EDTA (pH 7,4) bei 4 °C dialysiert und die Dialyseflüssigkeit mehrmals gewechselt.

Zur Kontrolle wird anschließend eine Agarose-Elektrophorese durchgeführt. Bei erfolgreicher Acetylierung der LDL kann die Proteinbande der Acetyl-LDL bei einem höheren Rf-Wert (etwa auf der Höhe der HDL) lokalisiert werden. Andernfalls schmiert die Bande vom Start an.

#### *4.4.2.2.4 Proteinbestimmung nach Lowry*

Lösungen:

Reagenz A:	2,0 % $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,1 mol/l NaOH
Reagenz B:	1,0 % Kalium-Natrium-Tartrat 0,5 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ einzeln lösen, dann zusammengeben
Reagenz C:	50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B

Prüflösung:

100 µl Probe mit 2 ml Reagenz C gut mischen und 10 min stehen lassen.

100 µl Folin-Reagenz (Fa. Merck, Nr. 9001) zugeben, gut mischen und 30 min stehen lassen.

100 µl Triton-X-100 (2,5 %ig in A.dest.) zugeben.

Absorptionsmessung gegen Reagenz + Folin + Triton als  
Leerwert Wellenlänge: 660 nm

Eichlösung:

0,1 % BSA-Lsg.

10-50 µl = 10 - 50 µg BSA/Ansatz

#### **4.4.2.2.5 Auftauen und Kultivierung der Zellen**

1. Ampulle aus Stickstoffbehälter entnehmen und 5 min bei 37 °C im Wasserbad erwärmen
2. Inhalt in Zentrifugenröhrchen überführen, mit 5 ml DMEM-Medium verdünnen
3. Zentrifugation bei 2.000 Upm, 1 min
4. Überstand absaugen, 5 ml DMEM-Medium zugeben und Zellen vorsichtig mit Pasteurpipette suspendieren
5. Zentrifugation bei 2.000 Upm, 1 min
6. Überstand absaugen, mit 1 ml DMEM-Medium Zellen suspendieren, auf eine große Petrischale mit 15 ml DMEM-Medium geben
7. Inkubation im Brutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C
8. Medium alle 24 h wechseln

#### **4.4.2.2.6 Versuchsablauf zur Bestimmung des Einbaus von radioaktiv markiertem acLDL in Cholesterinester**

1. Anzüchten der Zellen in Multischalen
  2. Beladung mit Acetyl-LDL 6-8 h
  3. Inkubation mit Substanzen 18 h
  4. Inkubation mit <sup>14</sup>C-Oleat 4 h
- a) Anzüchten der Zellen in Multischalen  
Ca. 6 - 8 Petrischalen werden auf 10 Multischalen (6er Multischalen; Nunc Nr. 150229) gesplittet und in 1 ml DMEM pro Multischaleneinheit 24 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert
- b) Beladung mit Acetyl-LDL  
- Mediumwechsel: 2 ml DMEM-Medium pro Multischaleneinheit  
- Zugabe von 80 µg Acetyl-LDL/2 ml DMEM  
- Inkubation 6 - 8 h; 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>
- c) Substanzzugabe  
- Substanzen in 20 µl Ethanol bzw. bidest. Wasser gelöst zugeben (ohne Mediumwechsel). Inkubationen, die mit wasserlöslichen Substanzen durchgeführt werden, enthalten ebenfalls 20 µl Ethanol/2 ml Medium  
- Inkubation 18 h; 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>

d) Zugabe von  $^{14}\text{C}$ -Oleat

Für die letzten 4 h der Inkubation mit Substanzen werden  
15,7  $\mu\text{l}$   $^{14}\text{C}$ -Oleat-Komplex/2 ml DMEM zugegeben.

e) Aufarbeitung der Monolayer

- Schalen mit PBS-Puffer waschen ( 2 - 3 mal, 2 ml)
- anschließend Zellen mit 500  $\mu\text{l}$  PBS von MS-Einheit lösen
- nochmals 500  $\mu\text{l}$  PBS zugeben und die Zelllösung im Eisbad in Chromschwefelsäure-gespülte Röhrchen füllen
- Zentrifugation: 10 min bei 2.000 Upm (Labofuge 6000, Heraeus)
- Überstand abgießen und 500  $\mu\text{l}$  PBS auf Pellet geben, gut mischen
- Beschallung: 2 x 20 sec, 30 W im Eisbad
- 100  $\mu\text{l}$  für Proteinbestimmung nach Lowry (1951)
- 300  $\mu\text{l}$  für Lipidextraktion

f) Extraktion der Lipide aus dem Zellhomogenat

- 300  $\mu\text{l}$  Zellhomogenat
- + ca. 100.000 dpm  $^3\text{H}$ -Cholesterinester als int. Standard
- + 1,0 ml Aqua dest.
- + 3,0 ml  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (2:1; v/v), Lichrosolv-Qualität gut mischen
- Zentrifugation: 5 min bei 2.000 Upm
- Unterphase ( $\text{CHCl}_3$ -Phase) vorsichtig abnehmen und in ein neues Röhrchen geben
- nochmals 2 ml  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  zugeben und Vorgang wiederholen
- Unterphasen vereinigen und im Vakuum (Exsikkator) trocknen

Wird zusätzlich eine Bestimmung der Menge von verestertem und unverestertem Cholesterin durchgeführt, wird als interner Standard 30  $\mu\text{l}$  Cholesterinformiat in Ethanol (36 mg/100 ml Ethanol) zugegeben.

g) Dünnschichtchromatographie zur Isolierung von Cholesterin-<sup>14</sup>C-oleat

- Trockene Proben in 50 µl CHCl<sub>3</sub> aufnehmen und auf DC-Platten (Kieselgel LK5D Linear-K, Fa. Whatman) auftragen
- Laufmittel: n-Hexan/Diethylether/Eisessig (85:15:1 v/v)
- Laufzeit: ca. 45 min bei Kammersättigung
- Referenz: Cholesterin-<sup>14</sup>C-oleat
- Platten trocknen lassen und anschließend mit einer Beta-Kamera (LB 292, Fa. Berthold) ablichten
- Cholesterin-Flecken markieren und direkt in Szintillationsgefäße ausschaben
- 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Instagel II, Fa. Packard) zugeben und die Radioaktivität in einem Flüssigszintillationszähler (Rackbeta 1219, LKB-Wallac) messen.

h) HPTLC zur Bestimmung der Menge von verestertem und unverestertem Cholesterin

Die getrockneten Extrakte aus dem Zellhomogenat werden in 30 µl Chloroform aufgenommen und davon jeweils 0,5 µl mit dem Nanomat (Fa. Camag) mittels 0,5 µl-Kapillaren auf HPTLC-Fertigplatten (Platten Kieselgel 60, 20 x 10 cm, Fa. Merck) in einem Abstand von 0,5 cm aufgetragen. Die HPTLC-Platten wurden zuvor in dem Laufmittel n-Hexan, n-Heptan, Diethylether, Eisessig (63:18,5:18,5:1,5 v/v) zur Reinigung einem Vorlauf unterzogen, anschließend eine Stunde bei 100 °C aktiviert und vor Auftragen der Proben wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

Als Eichlösung wird eine Mischung aus Cholesterin, Cholesterinester und Cholesterinformiat in einem Bereich von 0,0125-0,2 µg aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt in einer Linearkammer mit 4 ml Laufmittel (s.o.) für 10 min. Nach Trocknung der Platte für 10 min bei 100 °C werden die aufgetrennten Komponenten durch Eintauchen in das HPTLC-Tauchbad (10 sec) und Entwicklung für 20 min bei 100 °C sichtbar gemacht. Nach Abkühlung der Platten wird die Masse der Komponenten durch Fluoreszenz-Densitometrie (Anregungswellenlänge 366 nm, Emissionswellenlänge 510 nm) mit einem Dünnschicht-Scanner (Fa. Camag) und Auswertung der Peak-Flächen mit dem Integrator SP 4100 (Spectra Physics) bestimmt.



#### 4.4.3 Ergebnisse und Diskussion

Untersucht man die zeitabhängige Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Acetyl-LDL durch Maus-Peritonealmakrophagen, so findet man einen stetigen Anstieg der intrazellulär gebundenen Radioaktivität, eine geringfügige Zunahme des unveresterten Cholesterins und eine zunehmende Menge an intrazellulär gespeichertem Cholesterinester (Abb. 4.8).

Während nach 6stündiger Inkubation in Gegenwart von Acetyl-LDL noch geringfügig mehr unverestertes Cholesterin als Cholesterinester intrazellulär gefunden wird, verschiebt sich die Relation Cholesterin/Cholesterinester mit zunehmender Cholesterinbeladung der Makrophagen deutlich zugunsten des Cholesterinesters.

Bei Inkubation in einem Lipoprotein-freien Medium (Kontroll-experiment) hingegen findet man zu allen untersuchten Zeiten deutlich mehr unverestertes Cholesterin als Cholesterinester; auffällig ist hier die mit einem Anstieg der zellgebundenen Proteinmenge einhergehende Zunahme an intrazellulärem Cholesterin nach 48stündiger Inkubation im Vergleich zur 24stündigen Inkubation (Abb. 4.8). Der Zuwachs an zellulärem Protein darf als Zeichen der Proliferation als Ausdruck einer verstärkten Cholesterinsynthese der Zellen gewertet werden. Da die Zellproliferation auch bei den in Gegenwart von Acetyl-LDL inkubierten Makrophagen zwischen der 24. und 48. Stunde der Inkubation einzutreten scheint, bietet sich für Screening-Untersuchungen zur Auffindung von Substanzen, die die Aufnahme von Cholesterin in die Makrophagen bzw. dessen Veresterung inhibieren, die 24stündige Inkubation in Gegenwart von Acetyl-LDL an, nach der keine wesentliche Zellproteinveränderung, aber bereits eine deutliche Zunahme des Cholesterinestergehaltes der Makrophagen nachzuweisen ist. Das unterschiedliche Verhalten der Makrophagen bei Inkubation in Lipoprotein-freiem Medium bzw. in Gegenwart von Acetyl-LDL wird in Abbildung 4.9 besonders deutlich: Die durch Acetyl-LDL mit Cholesterin beladenen Makrophagen weisen bereits nach 6 Stunden einen fast ebenso hohen Cholesterinestergehalt wie Cholesteringehalt auf, während nach 24stündiger Inkubation die Menge gespeicherten Cholesterinesters die an Cholesterin um den Faktor 2 übertrifft, wobei pro mg Zellprotein fast fünf-

mal soviel Gesamtcholesterin nachzuweisen ist. Dagegen finden wir bei Inkubation in Lipoprotein-freiem Medium erwartungsgemäß keine Zunahme des Gesamtcholesterins, allenfalls ist mit länger dauernder Inkubation eine leichte Verschiebung des Cholesterin/Cholesterinester-Quotienten zugunsten des Cholesterinestergehaltes festzustellen.

Inkubiert man die Makrophagen in Gegenwart von 100 µg  $^3\text{H}$ -Acetyl-LDL anstelle von 50 µg  $^3\text{H}$ -Acetyl-LDL, verdoppelt man also die angebotene Menge Lipoprotein, so wird etwas mehr Radioaktivität und Cholesterin von den Makrophagen aufgenommen, ansonsten aber ein ähnliches Ergebnis erzielt, wie es in den Abb. 4.8 und 4.9 graphisch dargestellt ist.

Ein weiteres Experiment diente der Beantwortung der Frage, ob ein Zusatz von Lipoprotein-haltigen Kälberserum zum Inkubationsmedium nach der Beladung der Makrophagen mit Cholesterin durch Acetyl-LDL den intrazellulären Cholesterin- und Cholesterinester-Gehalt verändert oder nicht. In einem Pulse-Chase-Experiment wurden die Makrophagen zunächst 24 h in Gegenwart von  $^3\text{H}$ -Acetyl-LDL und dann zum Teil in Anwesenheit, zum Teil in Abwesenheit von fötalem Kälberserum weitere 24 h inkubiert: Es ergab sich keine signifikante Differenz im zellulären Cholesterin- bzw. Cholesterinestergehalt.

Ein Zusatz von fötalem Kälberserum zum Inkubationsmedium während des Screenings potentieller Wirksubstanzen könnte die in Experimenten mit Referenz- und Prüfsubstanzen aufgetretenen zelltoxischen Effekte verringern.

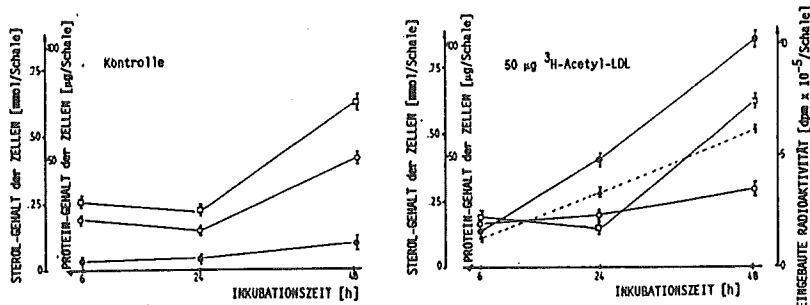


Abb. 4.8: Einfluß der Inkubationszeit auf die aufgenommene Radioaktivitätsmenge ( $\Delta$ ), den Proteingehalt ( $\square$ ) und den Gehalt an freiem Cholesterin ( $\circ$ ) bzw. Cholesterinester ( $\bullet$ ) von Makrophagen nach Inkubation in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. in Gegenwart von 50  $\mu\text{g/ml}$   $^3\text{H}$ -markierten acetylierten LDL.

Residente Peritoneal-Makrophagen wurden mit Hilfe einer 0,9 %igen NaCl-Lösung, welche 0,5 U Heparin enthielt, aus Mäusen gewonnen und bei 37 °C in DMEM, welches 10 % fötales Kälberserum enthielt, in einem Brutschrank in einer CO<sub>2</sub>/Luftatmosphäre (1:19) kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium ersetzt durch DMEM, welches humanes lipoproteinfreies Serum mit oder ohne Zusatz von 50  $\mu\text{g/ml}$   $^3\text{H}$ -Acetyl-LDL enthielt. Nach 24stündiger Inkubation wurden die Zellen von der Petrischale abgeschabt, mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und mittels Ultraschall homogenisiert. Das Zellprotein wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Cholesterin und Cholesterinester wurden mit Chloroform/Methanol (2:1; v/v) extrahiert und auf HPLC-Platten (Fa. Merck) aufgetragen, welche anschliessend mit n-Hexan/ n-Heptan/ Diethylether/ Essigsäure (63:18,5:18,5: 1) entwickelt wurden. Die Visualisierung der Lipidflecken erfolgte oxidativ nach Halpaap (1978). Die Ausbeutebestimmung bei den Extraktionsschritten und bei der sich anschliessenden densitometrischen Quantifizierung erfolgte durch Zusatz von Cholesterinformiat als Standard. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von drei Bestimmungen.

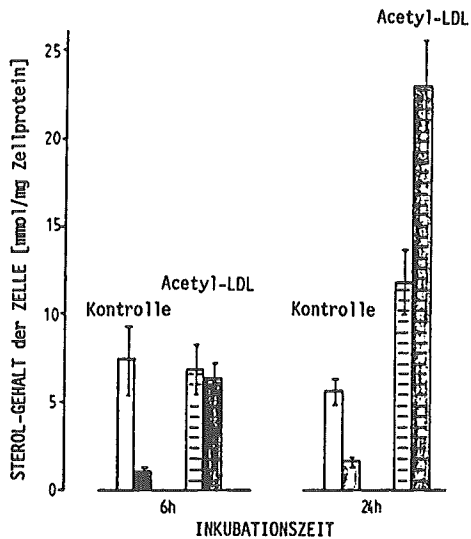


Abb. 4.9: Gehalt von Peritonealmakrophagen der Mäus an freiem Cholesterin (offene Balken) und verestertem Cholesterin (dunkle Balken) nach Beladung mit 50 µg/ml <sup>3</sup>H-markierten acetylierten LDL, im Vergleich zu mit Lipoprotein-freiem Serum inkubierten Zellen (Kontrolle). Die experimentellen Details sind in der Legende zu Abb. 4.8 beschrieben.

Bei der ersten Prüfung von Referenzsubstanzen in diesem Testsystem stellte sich heraus, daß zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführte Experimente zwar in der Tendenz ähnliche Ergebnisse hatten, daß die Streuung jedoch erheblich war. Insbesondere zeigten auch die in Abwesenheit von Substanzen inkubierten Zellen (Kontrollen) deutliche Unterschiede in der Cholesterin-Cholesterinester-Relation. Auf der Suche nach den Gründen für diese mangelnde Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde herausgefunden, daß die Qualität der jeweils verwendeten acetylierten LDL für diese relativ großen Streuungen verantwortlich war. Dabei scheint besonders wichtig zu sein, daß die Low-Density-Lipoproteine unmittelbar nach ihrer Isolierung durch Ultrazentrifugation unter standardisierten Bedingungen acetyliert werden.

Umfangreiche Untersuchungen dienten der Beantwortung der Frage, ob dieser Test auch mit einer permanenten Makrophagen-Zelllinie, mit Hautfibroblasten oder mit den Hepatomazellen HepG2 durchgeführt werden könnte; dann nämlich wäre auch die Verwendung von Mäusen zur Gewinnung der Peritonealmakrophagen zu verzichten, der Tierverbrauch ließe sich also weiter reduzieren.

Tabelle (4.4) zeigt den Einfluß von Test- und Referenzsubstanzen auf die Menge intrazellulär gespeicherten veresterten Cholesterins, unveresterten Cholesterins und auf den prozentualen Anteil an unverestertem Cholesterin in der Zelllinie P388D<sub>1</sub>.

Neben den bekannten ACAT-Inhibitoren Sandoz 58-035 und Progesteron führte auch die Inkubation in Gegenwart von Octimibat und anderen Substanzen aus der Nattermann-Chemie zu einer ausgeprägten Hemmung der Cholesterinveresterung und damit zu einer Erhöhung des relativen Anteils an freiem Cholesterin. Unter den gewählten Bedingungen zeigten die auf dem Markt befindlichen Lipidsenker Bezafibrat, Gemfibrozil und Probucol keine Wirkung.

Fügt man während der letzten Phase der Inkubation dem Inkubationsmedium <sup>14</sup>C-Oleat zu, so ist die Menge der in das Cholesterinoleat inkorporierten Radioaktivität ein Maß für die ACAT-Aktivität in dem gewählten Zeitraum. Obwohl bei der Interpretation des Verhältnisses von freiem zu verestertem Cholesterin (Tab. 4.4) im Vergleich zu der aus der Menge gebildeten <sup>14</sup>C-Cholesterinoleats ermittelten ACAT-Aktivität komplexere Vorgänge bzw. Regulationsprozesse in Betracht gezogen werden müssen, stimmen zumindest in der Tendenz die in Tabelle 4.5 aufgeführten relativen ACAT-Aktivitäten gut mit den Ergebnissen der Tabelle 4.4 überein.

Tab. 4.4: Der Einfluß von Referenzsubstanzen und Verbindungen, welche in unseren chemischen Laboratorien synthetisiert wurden, auf den Cholesterin-Cholesterin-esterzyklus in der makrophagenähnlichen Zelllinie P388D<sub>1</sub>.

Die Zellen wurden in DMEM unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum kultiviert. Nach 24 h wurden das Medium gewechselt, wobei zusätzlich 40 µg/ml acetylierte LDL und 0,1 % BSA zugesetzt wurden. Nach einer 16stündigen Inkubation bei 37 °C und Zusatz der Testsubstanzen (10 µmol/l Endkonzentration) wurde weitere 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Sandoz-Substanz 58-035 wurde mit  $c = 3,2 \mu\text{mol/l}$  als Referenzsubstanz eingesetzt.

Die Zellen wurden anschliessend mit einem Gummischer abgekratzt, mit PBS-Puffer, pH 7,4, gewaschen und mittels Ultraschall homogenisiert. Das Zellprotein wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Cholesterin und Cholesterin-ester wurden mit Chloroform/Methanol (2:1, v/v) extrahiert, der unter Stickstoffgasstrom getrocknete Extrakt nach Auflösung in 30 µl Chloroform auf eine HPTLC-Platte aufgetragen und in n-Hexan/ n-Heptan/ Diethylether/ Essigsäure (63:18,5:18,5:1; v/v) entwickelt. Die Visualisierung und anschliessende fluoreszenzdensitometrische Auswertung erfolgte nach der Methode von Halpaap (1978). Zur Kontrolle der Ausbeute bei den Extraktionsschritten wurde Cholesterinformiat eingesetzt.

Substanz	Cholesterinester [nmol/mg Protein]	Cholesterin [nmol/mg Protein]	% Anteil von freiem Cholesterin am Gesamtcholesterin
Kontrolle	165,5	78,9	32,2
Sandoz 58-035	54,3	126,2	69,9
Progesteron	91,3	86,2	48,6
Bezafibrat	201,6	102,6	33,7
Gemfibrozil	199,3	118,8	37,3
Probucol	178,4	94,0	34,5
Octimibat	127,1	118,7	48,3
NAT04-451	162,5	142,9	46,8
NAT04-453	65,1	122,7	65,3
NAT04-432	71,1	143,5	66,9
NAT04-360	116,1	65,7	36,1
NAT04-363	122,9	91,7	42,7

Tab. 4.5: Der Einfluß von Referenzsubstanzen und Verbindungen, welche in unseren chemischen Laboratorien synthetisiert wurden, auf die Inkorporation von  $^{14}\text{C}$ -Oleat in  $^{14}\text{C}$ -markierte Cholesterinester in der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie P388D<sub>1</sub>. Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zu Tabelle 4.4 beschrieben, durchgeführt, mit der Ausnahme, daß für die letzten 4 h der Substanzinkubation  $^{14}\text{C}$ -Oleat (0,5  $\mu\text{Ci/ml}$ ), gebunden an BSA, zugesetzt wurde. Die Abtrennung und Quantifizierung der  $^{14}\text{C}$ -markierten Cholesterinester erfolgte, wie im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben.

Substanz	relative ACAT-Aktivität (% Änderung der Bildung von Cholesterin- $^{14}\text{C}$ -Oleat)
Sandoz 58-035	- 66,8
Progesteron	- 31,3
Bezafibrat	- 31,5
Gemfibrozil	- 6,1
Probucol	- 14,6
Octimibat	- 12,7
NAT 04-451	- 59,9
NAT 04-453	- 67,9
NAT 04-360	+ 12,8
NAT 04-363	- 2,0

Vergleicht man die mit Hilfe von P388D<sub>1</sub>-Zellen gewonnenen Ergebnisse mit denen, die in Experimenten mit Maus-Peritonealmakrophagen erzielt worden sind, so wird deutlich, daß die Makrophagen-Zelllinie auf die Inkubation in Gegenwart von Acetyl-LDL weniger mit exzessiver Cholesterinspeicherung als mit stimulierter Zellproliferation reagiert. Dennoch sind diese Zellen für das Grundscreening auf antiatherosklerotisch wirkende Substanzen geeignet.

Als weitere permanente Maus-Makrophagen-Zelllinie wurden J774-Zellen untersucht: Inkubiert man diese Zellen in Anwesenheit von Acetyl-LDL im Medium für 20 h, so zeigt sich eine konzentrationsabhängige Zunahme des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Oleat in die Cholesterinester, der bei einer Konzentration von etwa 40  $\mu\text{g}$  Acetyl-LDL/ml Medium ein Maximum erreicht (Abb. 4.10A).

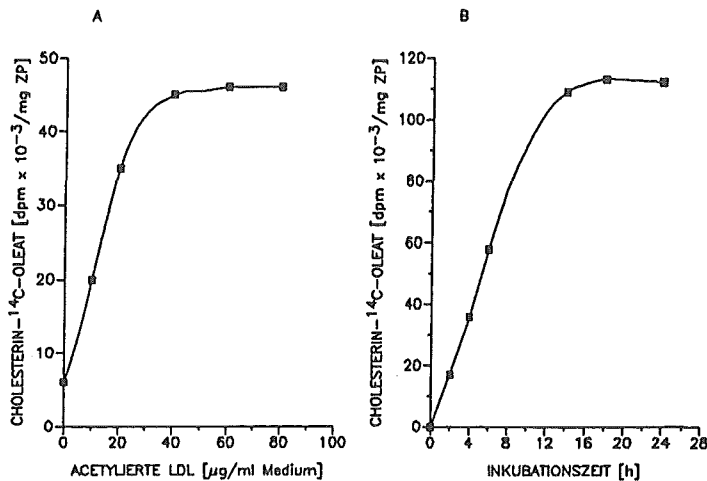


Abb. 4.10: Einfluß der Konzentration von acetylierten LDL (acLDL) (A) und der Inkubationszeit in Gegenwart von acLDL (B) auf die Inkorporation von  $^{14}\text{C}$ -Oleat in Cholesterinester in der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie J774.

(A) Die Zellen wurden in DMEM/ 5 % FKS/ 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren für 20 h bei 37 °C mit verschiedenen acLDL-Konzentrationen inkubiert. Während der letzten 4 h wurde 0,2 mmol/l  $^{14}\text{C}$ -Oleat (9,25 kBq/ml Medium), gebunden an BSA, zugesetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte, wie im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben.

(B) Die Inkubationen erfolgten, wie unter A beschrieben, jedoch mit 40  $\mu\text{g/ml}$  acLDL und den angegebenen Inkubationszeiten.

Verfolgt man den zeitabhängigen Verlauf der Bildung von Cholesterin- $^{14}\text{C}$ -Oleat in Anwesenheit von 40  $\mu\text{g}$  Acetyl-LDL/ml Medium, so ist eine maximale ACAT-Aktivität nach etwa 14-18 h Inkubationsdauer zu erkennen (Abb. 4.10B). Eine weitere Steigerung könnte durch das limitierte Angebot an  $^{14}\text{C}$ -Ölsäure verhindert werden.

Tabelle 4.6 zeigt einen Vergleich zwischen frisch isolierten Maus-Peritoneal-Makrophagen, P388D<sub>1</sub>-Makrophagen und J774-Makrophagen hinsichtlich Acetyl-LDL-vermittelter Cholesterinbeladung und Stimulierung der ACAT-Aktivität. Wie die Tabelle verdeutlicht, zeichnen sich J774-Makrophagen im Vergleich zu



frisch isolierten Maus-Peritonealmakrophagen und P388D<sub>1</sub>-Zellen durch eine bessere Fähigkeit zur Cholesterinspeicherung und durch eine stärkere Stimulierung der ACAT-Aktivität infolge der Cholesterinbeladung aus. Der prozentuale Anteil nicht veresterten Cholesterins am Gesamtcholesterin betrug in allen Zellen in Abwesenheit von Acetyl-LDL im Medium etwa 80 %, in Anwesenheit von Acetyl-LDL etwa 30-40 %.

**Tab. 4.6:** Beladungskapazität und Stimulierung der ACAT-Aktivität verschiedener Makrophagen-ähnlicher Zelllinien unter Cholesterinbeladung mit acetylierten LDL (acLDL).

Die Zellen wurden in DMEM/ 5 % FKS/ 1% nicht-essentiellen Aminosäuren für 20 h bei 37 °C mit 40 µg/ml acLDL inkubiert.

Während der letzten 4 h wurde 0,2 mmol/l <sup>14</sup>C-Oleat (9,25 kBq/ml Medium), gebunden an BSA, zugesetzt. Zur Bestimmung der ACAT-Aktivität wurde die Radioaktivität in der Cholesterinesterfraktion nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Chloroform/Methanol-Extrakte bestimmt.

Der Gehalt an verestertem bzw. unverestertem Cholesterin wurde densitometrisch nach HPTLC-Trennung der Extrakte bestimmt.

Zellen	Cholesterin- beladung [-fach]*	Stimulation der ACAT-Aktivität [-fach]**
Peritoneal- makrophagen	3,0	4,0
P388D <sub>1</sub>	2,8	3,0 - 5,0
J774	3,6 - 4,1	9,0 - 12,0

\* Verhältnis des Gehaltes an verestertem und unverestertem Cholesterin nach Zusatz von acetylierten LDL während der Inkubation zum Gesamtcholesteringehalt ohne Zusatz von acLDL.

\*\* Verhältnis der Menge an Cholesterin-<sup>14</sup>C-Oleat nach Zusatz von acetylierten LDL während der Inkubation zur Radioaktivitätsmenge ohne Zusatz von acLDL.

Aufgrund dieser Ergebnisse können J774-Zellen als besonders geeignet für die Prüfung von Testsubstanzen auf Beeinflussung des "Cholesterinester-Zyklus" angesehen werden. Repräsentativ

sind einige Ergebnisse, die mit diesen Zellen erzielt worden sind, tabellarisch aufgeführt (Tab. 4.7).

**Tab. 4.7: Der Einfluß von Referenzsubstanzen und Verbindungen, welche in unseren chemischen Laboratorien synthetisiert wurden, auf die Inkorporation von  $^{14}\text{C}$ -Oleat in  $^{14}\text{C}$ -markierte Cholesterinester in der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie J774.**  
Die Zellen wurden in DMEM/ 2 % FKS/ 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren in Gegenwart von 40 µg/ml acetylierten LDL für 6 h bei 37 °C inkubiert. Die in Ethanol gelösten Testsubstanzen wurden in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt, wobei die Lösungsmittelendkonzentration 0,1 % betrug. Während der letzten 4 h der sich anschliessenden 20stündigen Inkubation wurde 0,2 mmol/l  $^{14}\text{C}$ -Oleat (9,25 kBq/ml Medium), gebunden an BSA, zugesetzt. Zur Bestimmung der ACAT-Aktivität wurde die Radioaktivität in der Cholesterinesterfraktion nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Chloroform/Methanol-Extrakte bestimmt. Der Gehalt an verestertem bzw. unverestertem Cholesterin wurde densitometrisch nach HPLC-Trennung der Extrakte bestimmt.

Substanz	Konz. [µmol/l]	relative ACAT-Aktivität [% Änderung der Bildung von Cholesterin- $^{14}\text{C}$ -Oleat]	% Anteil von freiem Cholesterin am Gesamt- Cholesterin
Kontrolle	-	-	37
Sandoz 58-035	3,16	- 65	78
NAT 04-538	3,16 10	- 37 - 76	44 66
NAT 04-544	3,16 10	- 74 - 71	68 60
NAT 04-547	3,16 10	- 17 - 26	47 49
NAT 04-550	3,16 10	- 3 - 10	41 45
NAT 04-558	3,16 10	- 58 - 86	52 55

Weitere permanente Makrophagen-Zelllinien wurden auf ihre Beladungsfähigkeit mit Cholesterin und auf die Veresterung von Cholesterin geprüft. Tabelle 4.8 zeigt einen Vergleich zwischen WEHI-, RAW-, PU5-1R- und IC21-Zellen hinsichtlich Acetyl-LDL-vermittelter Cholesterinbeladung und Stimulierung der ACAT-Aktivität.

**Tab. 4.8:** Beladungskapazität und Stimulierung der ACAT-Aktivität verschiedener Makrophagen-ähnlicher Zelllinien unter Cholesterinbeladung mit acetylierten LDL (acLDL).

Die Zellen wurden in DMEM/ 5 % FKS/ 1% nicht-essentiellen Aminosäuren für 20 h bei 37 °C in Gegenwart von 40 µg/ml acLDL inkubiert.

Während der letzten 4 h wurde 0,2 mmol/l <sup>14</sup>C-Oleat (9,25 kBq/ml Medium), gebunden an BSA, zugesetzt. Zur Bestimmung der ACAT-Aktivität wurde die Radioaktivität in der Cholesterinesterfraktion nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Chloroform/Methanol-Extrakte bestimmt.

Der Gehalt an verestertem bzw. unverestertem Cholesterin wurde densitometrisch nach HPTLC-Trennung der Extrakte bestimmt.

Zellen	Cholesterin-Beladung [-fach]*	Stimulation der ACAT-Aktivität [-fach]**
WEHI-3	2,03	n.d.
RAW	1,90	n.d.
PU5-1R	1,72	3,71
IC21	2,90	6,50

\* Verhältnis des Gehaltes an verestertem und unverestertem Cholesterin nach Zusatz von acetylierten LDL während der Inkubation zum Gesamtcholesteringehalt ohne Zusatz von acLDL.

\*\* Verhältnis der Menge an Cholesterin-<sup>14</sup>C-Oleat nach Zusatz von acetylierten LDL während der Inkubation zur Radioaktivitätsmenge ohne Zusatz von acLDL.

Wie die Tabelle verdeutlicht, zeichnet sich die Zelllinie IC21 durch eine bessere Fähigkeit zur Cholesterinspeicherung und im Vergleich zu PU5-1R-Makrophagen durch annähernd doppelt so starke Stimulierung der ACAT-Aktivität aus. Der prozentuale Anteil nicht veresterten Cholesterins betrug in allen Zellen

in Abwesenheit von Acetyl-LDL im Medium etwa 85 %, in Anwesenheit von Acetyl-LDL etwa 50 %. J774-Zellen zeigen aber von allen geprüften Makrophagen-Zelllinien die beste Fähigkeit für eine acLDL-vermittelte Cholesterinspeicherung und eine Stimulierung der ACAT-Aktivität.

Die Makrophagen-Zelllinien WEHI-3 und RAW wurden näher charakterisiert: Inkubiert man diese Zellen in Anwesenheit von Acetyl-LDL im Medium für 20 h, so zeigt sich eine Konzentrations-abhängige Zunahme der Cholesterinbeladung (Abb. 4.11A) und (4.12A).

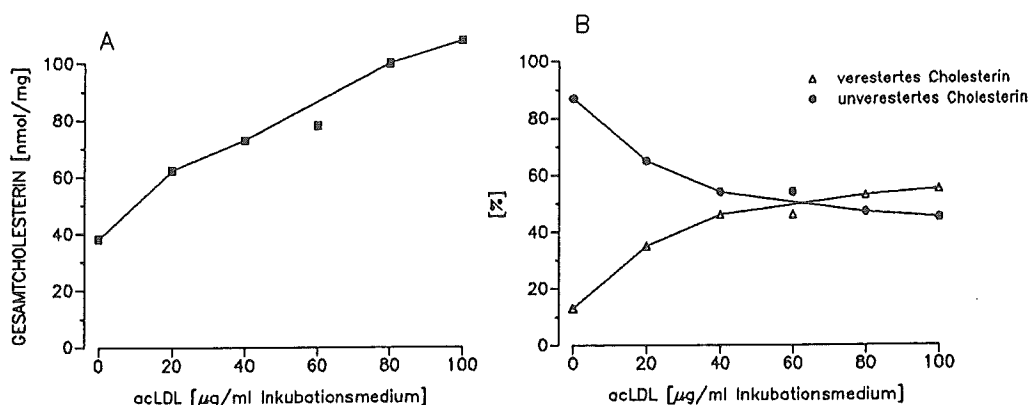


Abb. 4.11: Einfluß der Konzentration von acetylierten LDL (acLDL) auf die Cholesterinbeladung (A) bzw. auf das Cholesterin-Cholesterinester-Verhältnis (B) in der makrophagenähnlichen Zelllinie WEHI-3.

Die Zellen wurden in DMEM/ 10 % FKS/ 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren für 20 h bei 37 °C in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen acLDL inkubiert. Die Zellen wurden mittels Gummiwischer abgeschabt, durch Ultraschall homogenisiert, und die Lipide mit Chloroform/Methanol (2:1; v/v) extrahiert. Zur Ausbeutebestimmung während der Extraktionsschritte diente Cholesterinformiat als interner Standard. Der Gehalt an verestertem bzw. unverestertem Cholesterin wurde nach Auftrennung der Lipidfraktion auf HPTLC-Platten densitometrisch bestimmt.

\* Die Summe aus verestertem und unverestertem Cholesterin wurde gleich 100 % gesetzt.

Diese verläuft bis zu einer Konzentration von 40  $\mu\text{g}$  Acetyl-LDL der beiden Zelllinien identisch und erreicht bei einer Konzentration von 60-80  $\mu\text{g}$  bei den RAW-Makrophagen ein Maximum. Bei den WEHI-Makrophagen kann bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}$  Acetyl-LDL eine weitere Zunahme der Cholesterinbeladung beobachtet werden.

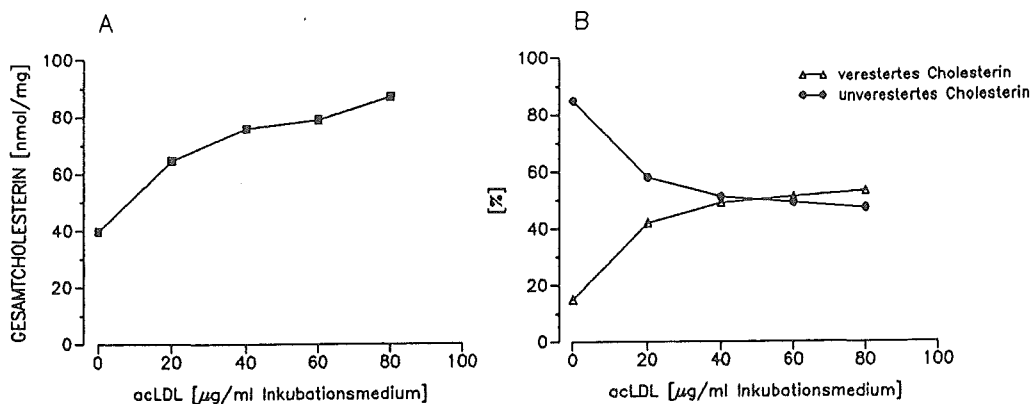


Abb. 4.12: Einfluß der Konzentration von acetylierten LDL (acLDL) auf die Cholesterinbeladung (A) bzw. auf das Cholesterin-Cholesterinester-Verhältnis (B)\* in der makrophagenähnlichen Zelllinie RAW 264.7. Die weiteren experimentellen Details sind in der Legende zu Abb. 4.11 beschrieben.

\* Die Summe aus verestertem und unverestertem Cholesterin wurde gleich 100 % gesetzt.

Betrachtet man das prozentuale Verhältnis von unverestertem zu verestertem Cholesterin in Abhängigkeit von der Acetyl-LDL-Konzentration, so läßt sich eine Konzentrations-abhängige prozentuale Zunahme von verestertem Cholesterin erkennen, welches bei einer Konzentration von 60  $\mu\text{g}$  Acetyl-LDL in beiden Zelllinien annähernd 50 % des gesamten gespeicherten Cholesterin erreicht (Abb. 4.11B und 4.12B). Die durch Beladung der Makrophagen mit Cholesterin stimulierte Cholesterinveresterung (ACAT) läßt sich darüber hinaus durch Erhöhung der Acetyl-LDL-Konzentration in dem Inkubationszeitraum von 20 h nur noch geringfügig steigern.

Menschliche Hautfibroblasten lassen sich relativ gut kultivieren und wurden daher dahingehend geprüft, ob sie auch für dieses Testmodell Verwendung finden können.

Menschliche Hautfibroblasten internalisieren besonders gut kationisierte LDL. Da aber relativ wenig Cholesterin in Form von Cholesterinester gespeichert wird, eignen sich diesen Zellen weniger für Untersuchungen zum Einfluß von Substanzen auf den intrazellulären Gehalt an freiem bzw. verestertem Cholesterin, sondern eher für die Bestimmung der Inkorporation von  $^{14}\text{C}$ -Oleat in Cholesterinoleat als Maß für die Aktivität der ACAT. Abbildung 4.13 zeigt die Abhängigkeit des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Oleat in Cholesterinoleat von der Anwesenheit der Sandoz-Substanz 58-035 als Referenz (Substanz 436) und einiger Prüfsubstanzen. In allen Fällen konnte eine deutliche Hemmung der Bildung von Cholesterin- $^{14}\text{C}$ -Oleat festgestellt werden.

Diese Ergebnisse bestätigen qualitativ die mit Hilfe der Zelllinie P388D<sub>1</sub> gewonnenen Erkenntnisse (Tab. 4.5), lassen jedoch keinen quantitativen Vergleich zu.

Des weiteren wurde die Hepatoma-Zelllinie HepG2 auf ihre Eignung für das Screening ACAT-inhibitorischer Substanzen hin geprüft.

HepG2-Zellen lassen sich um ein Vielfaches besser in Gegenwart von kationisierten als in Gegenwart von Acetyl- oder nativen LDL mit Cholesterin beladen (Abb. 4.14A).

Während der Gehalt an freiem Cholesterin im Vergleich zur Kontrolle relativ konstant bleibt, nimmt die Menge an Cholesterinester/mg Zellprotein (Abb. 4.14B) zu. Dabei ist die Menge gespeicherten Cholesterins abhängig von der Menge kationisierten LDL im Inkubationsmedium (Abb. 4.15).

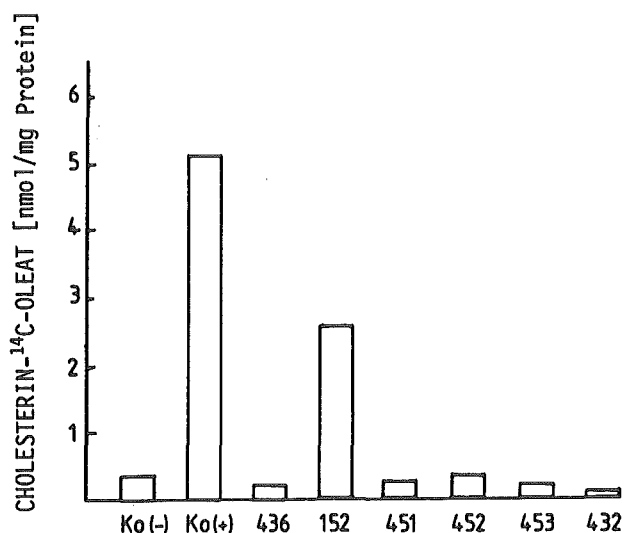


Abb. 4.13: Der Einfluß von Referenzsubstanzen und Verbindungen, welche in unseren chemischen Laboratorien synthetisiert wurden, auf die Inkorporation von <sup>14</sup>C-Oleat in <sup>14</sup>C-markierte Cholesterinester in humanen Hautfibroblasten.

Die Zellen wurden als Monolayer kultiviert und zwischen der 5. und 20. Passage für die Experimente eingesetzt. 7 Tage nach der letzten Passage wurde das Medium (DMEM/ 10 % FKS/ 1 % nicht-essentielle Aminosäuren) gewechselt gegen DMEM, welches 9 % Lipoprotein-freies Serum enthielt und die Zellen für weitere 20 h bei 37 °C inkubiert. Anschliessend wurden dem Medium 20 µg/ml kationisierte LDL, 0,2 mmol/l <sup>14</sup>C-Oleat, gebunden an BSA, und die in Ethanol gelösten Testsubstanzen ( $c = 31,6 \mu\text{mol/l}$ ) zugesetzt, wobei die Lösungsmittelkonzentration 1 % betrug. Als Referenz wurde die Sandoz-Substanz 58-035 (Substanz 436;  $3,16 \mu\text{mol/l}$ ) eingesetzt. Nach 24stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen abgeschabt, mit eiskaltem Phosphatpuffer, pH 7,4, gewaschen und mittels Ultraschall homogenisiert. Das Zellprotein wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Zur Bestimmung der ACAT-Aktivität wurde die Radioaktivität in der Cholesterinesterfraktion nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der n-Hexan-Extrakte (mobile Phase: Hexan/ Diethylether/ Essigsäure = 85/15/1, v/v) bestimmt.

Ko (-) = ohne kationisierte LDL und Substanzen  
Ko (+) = mit kationisierte LDL, ohne Substanzen

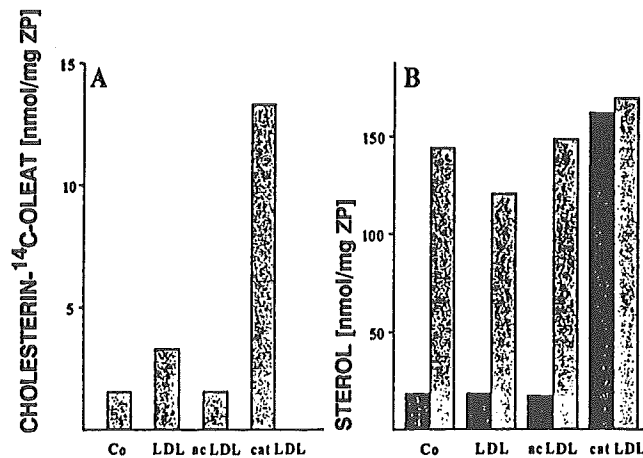


Abb. 4.14: Der Einfluß von nativen und modifizierten LDL auf die Bildung von Cholesterin-<sup>14</sup>C-Oleat (A) und auf die Cholesterin-Akkumulation (B) in HepG2 Zellen.

Die Zellen wurden 18 h bei 37 °C in DMEM/ 10 % FKS/ 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren in Gegenwart von nativen bzw. modifizierten LDL (acetylierten LDL, kationisierte LDL) inkubiert. Während der letzten 4 h der Inkubationszeit wurden 0,2 mmol/l <sup>14</sup>C-Oleat (9,25 kBq/ml) zugesetzt. Zur Bestimmung der ACAT-Aktivität wurde die Radioaktivität in der Cholesterinesterfraktion nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Chloroform/Methanol-Extrakte bestimmt.

Der Gehalt an verestertem bzw. unverestertem Cholesterin wurde densitometrisch aus den Extrakten bestimmt.

helle Balken = unverestertes Cholesterin

dunkle Balken = verestertes Cholesterin

Co = Kontrolle ohne Zusatz von Lipoproteinen



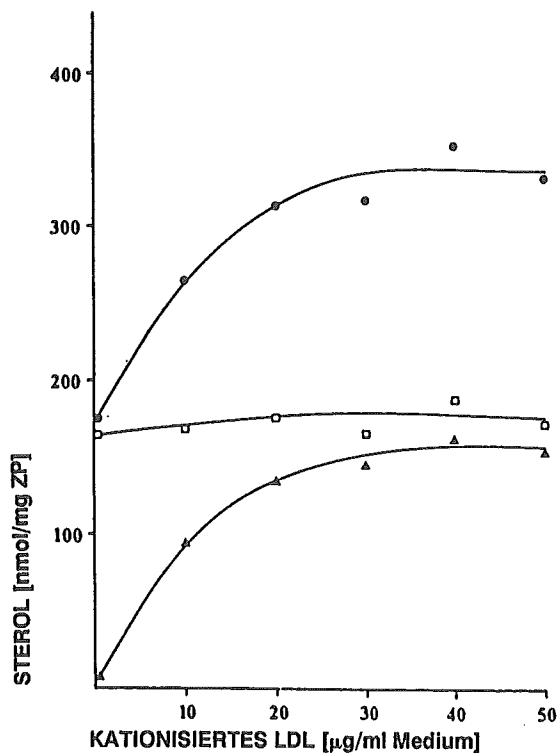


Abb. 4.15: Cholesterin-Akkumulation in der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 unter Beladung mit verschiedenen Konzentrationen von kationisierten LDL. Die Zellen wurden 18 h bei 37 °C in DMEM/ 10 % FKS/ 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren in Gegenwart verschiedener Konzentrationen kationisierter LDL im Kulturmedium inkubiert. Der Gehalt an verestertem bzw. unverestertem Cholesterin wurde densitometrisch nach HPTLC-Trennung der Extrakte bestimmt.

- Gesamtcholesterin
- ▲ verestertes Cholesterin
- freies Cholesterin

Die Aufnahme und Veresterung von Cholesterin erfolgt in den ersten 16 h der Inkubation relativ rasch, während danach kaum noch weiteres Cholesterin von der Zelle aufgenommen wird (Abb. 4.16B). Die Tatsache, daß während der gesamten Versuchsdauer von 48 h die Bildung von Cholesterin-<sup>14</sup>C-Oleat in Gegenwart von <sup>14</sup>C-Ölsäure nur geringfügig abnimmt (Abb. 4.16A), deutet auf eine nahezu unverändert hohe ACAT-Aktivität hin. Die leichte Abnahme der Bildung von radioaktiv markiertem Cholesterinester nach 24 h könnte auch durch das

limitierte Angebot an  $^{14}\text{C}$ -Ölsäure bedingt sein. Da diese orientierenden Untersuchungen es wahrscheinlich machten, daß sich auch HepG2-Zellen für ein Substanz-Screening eigneten, wurden einige ausgewählte Referenz- und Forschungssubstanzen auf ihren Einfluß auf die Bildung von Cholesterin- $^{14}\text{C}$ -Oleat hin geprüft. Repräsentative Ergebnisse sind in Tab. 4.9 zusammengefaßt.

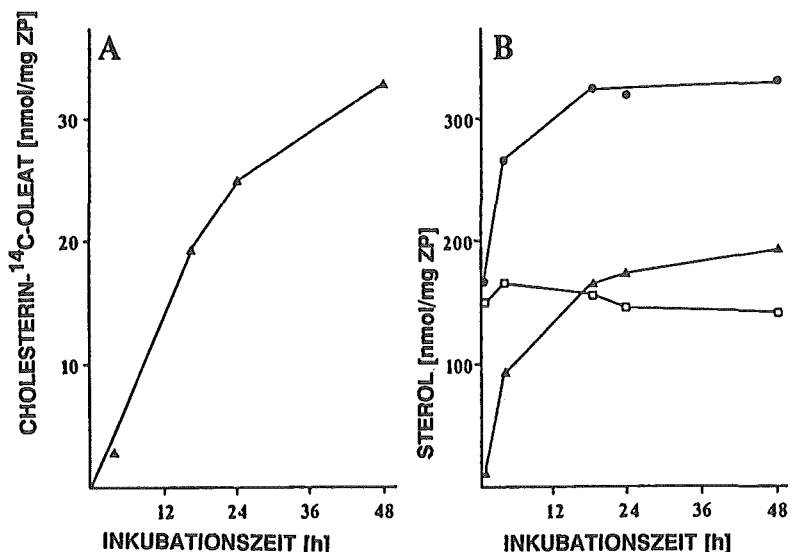


Abb. 4.16: Einfluß der Inkubationszeit auf die Bildung von Cholesterin- $^{14}\text{C}$ -Oleat (A) und auf die Cholesterin-Akkumulation (B) in der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2.

Die Zellen wurden für die angegebenen Inkubationszeiten bei 37 °C in DMEM/ 10 % FKS/ 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren in Gegenwart von 40 µg/ml kationisierter LDL) inkubiert. Während der letzten 4 h der Inkubationszeit wurden 0,2 mmol/l  $^{14}\text{C}$ -Oleat (9,25 kBq/ml) zugesetzt. Zur Bestimmung der ACAT-Aktivität wurde die Radioaktivität in der Cholesterinesterfraktion nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Chloroform/Methanol-Extrakte bestimmt.

Der Gehalt an verestertem bzw. unverestertem Cholesterin wurde densitometrisch nach HPTLC-Trennung der Extrakte bestimmt.

- Gesamtcholesterin
- ▲ verestertes Cholesterin
- freies Cholesterin

ZP = Zellprotein

**Tab. 4.9:** Der Einfluß von Referenzsubstanzen und Verbindungen, welche in unseren chemischen Laboratorien synthetisiert wurden, auf die Inkorporation von  $^{14}\text{C}$ -Oleat in  $^{14}\text{C}$ -markierte Cholesterinester in der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2.

Die Zellen wurden in DMEM/ 10 % FKS/ 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren in Gegenwart von 40  $\mu\text{g/ml}$  kationisierten LDL für 6 h bei 37 °C inkubiert. Die in Ethanol gelösten Testsubstanzen wurden in einer Endkonzentration von 31,6  $\mu\text{mol/l}$  zugesetzt, wobei die Lösungsmittelendkonzentration 1 % betrug. Während der letzten 4 h der sich anschließenden 20stündigen Inkubation wurden 0,2 mmol/l  $^{14}\text{C}$ -Oleat (9,25 kBq/ml Medium), gebunden an BSA, zugegeben. Zur Bestimmung der ACAT-Aktivität wurde die Radioaktivität in der Cholesterinesterfraktion nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Chloroform/Methanol-Extrakte bestimmt.

Substanz	relative ACAT-Aktivität (% Änderung in der Bildung von Cholesterin- $^{14}\text{C}$ -Oleat)
Sandoz 58-035	- 90
Octimibat	- 18
NAT 04-363	- 70
NAT 04-453	- 90
NAT 04-432	- 97

Für die Herstellung einer In-vitro-/In-vivo-Korrelation wurde ein In-vivo-Modell etabliert, in dem Substanzen geprüft werden können, die die Cholesterinveresterung und damit die Cholesterinspeicherung in Makrophagen inhibieren:

Kaninchen werden eine Woche Cholesterin-reich ernährt und damit die peripheren Gefäße mit Cholesterin "beladen". Nach etwa zweieinhalb Wochen Fütterung mit Normaldiät erreichen die Plasma-Cholesterinwerte wieder den Normbereich, während die Aortencholesteringehalte, wie Vorversuche zeigten, wegen einer fehlenden Spontanregression beim Kaninchen unverändert hoch blieb. Füttert man die Kaninchen länger mit Cholesterin-reichem Futter, so erreicht man eine höhere Beladung der Gefäßwände mit Cholesterin, benötigt allerdings dann auch eine längere Zeit, um wieder normale Plasma-Lipidwerte vorzufinden.

Als erste repräsentative Testsubstanz wurde der ACAT-Inhibitor Octimibat ausgewählt, der eine gute Wirkung im Modell "Cholesterin-Einschleusung und Cholesterinveresterung in Makrophagen" gezeigt hatte. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen (4.17-4.19) niedergelegt.

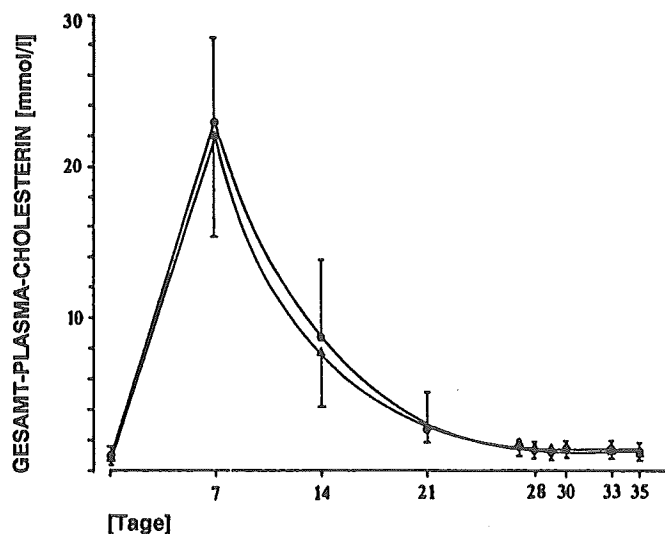


Abb. 4.17: Plasmacholesterin von 12 männlichen Neuseeländer Kaninchen, welche eine Woche eine cholesterinreiche und anschliessend eine normale Diät erhielten. Ab Tag 27 wurde einer Gruppe (6 Tiere) 30 mg/kg Octimibat (p.o.) täglich verabreicht. An den angegebenen Tagen wurde Blut abgenommen; als Antikoagulanzen dienten 3 mmol/l EDTA. Gesamt-Plasma-cholesterin wurde mit der CHOD-PAP-Methode (Boehringer Mannheim) bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte von 6 Tieren, wobei Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

- ▲ Kontrollgruppe
- Octimibat-behandelte Gruppe

Die tägliche Applikation von Octimibat hatte keinen Einfluß auf die Cholesterin-Konzentration im Plasma (Abb. 4.17), führte aber vom Tag der ersten Gabe an zu einer signifikanten Erhöhung des HDL<sub>2</sub>-Cholesterins (Abb. 4.18), das - wie auch aus den vorher beschriebenen Untersuchungen hervorgeht - ein Marker für die Stimulierung des "reverse cholesterol transport" sein könnte. Der Cholesterinester-Gehalt der Aorten der behandelten Tiere wurde deutlich reduziert (Abb. 4.19).

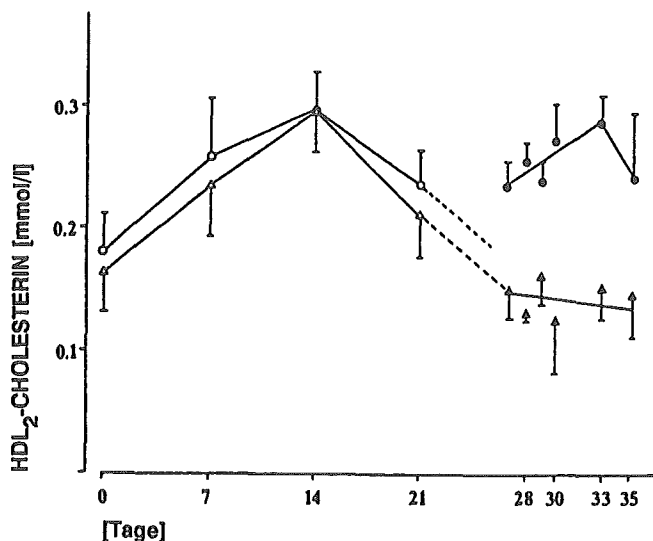
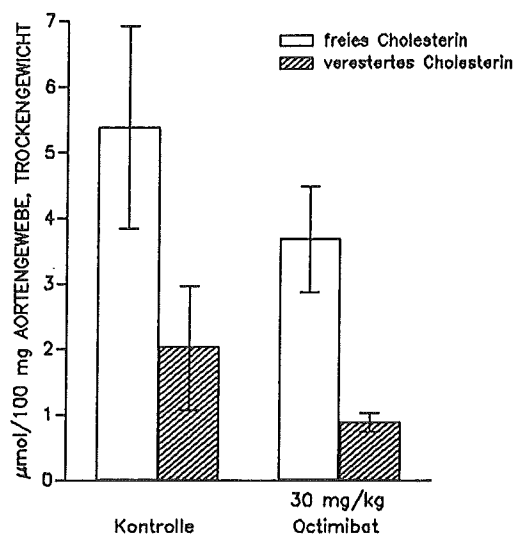


Abb. 4.18: Plasma-HDL<sub>2</sub>-Cholesterin der 12 männlichen Neuseeländer Kaninchen in dem in der Legende zu Abb 4.17 beschriebenen Versuch. HDL-Cholesterin wurde nach Präzipitation der ApoB-haltigen Lipoproteine mit Phosphorwolframsäure/MgCl<sub>2</sub> aus dem Zentrifugationsüberstand nach der CHOD-PAP-Methode bestimmt. HDL<sub>3</sub>-Cholesterin wurde nach Präzipitation von ApoB-haltigen Lipoproteinen mit Polyethylenglykol und HDL<sub>2</sub> aus dem Zentrifugationsüberstand bestimmt (Methode nach Kostner et al. (1985)). Die Werte sind Mittelwerte von 6 Tieren, wobei Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

- ▲ Kontrollgruppe
- Octimibat-behandelte Gruppe

Bei weiteren Untersuchungen mit Prüfsubstanzen stellte sich heraus, daß die Reduktion des Aorten-Cholesterins ein besserer Parameter für Wirksamkeit ist als die Erhöhung des HDL<sub>2</sub>-Cholesterins, da trotz Reduktion des Cholesteringehalts der Aorten bei mehreren Untersuchungen keine Beeinflussung der Plasma-Lipoproteine auftrat. In einigen Fällen erwiesen sich Substanzen, die gute In-vitro-Wirksamkeit gezeigt hatten, in vivo als nicht wirksam, da sie als Fettsäure-Derivate relativ schnell metabolisiert wurden und nur geringe Mengen Muttersubstanz im Plasma vorzufinden waren.



**Abb. 4.19:** Aorten-Cholesterin- und -Cholesterinesterwerte der 12 Neuseeländer-Kaninchen in dem in der Legende zu Abb. 4.17 beschriebenen Versuch. Nach 14tägiger Behandlung wurden die Kaninchen getötet und die Lipide nach Zerkleinerung und Extraktion der Aorten mit Chloroform/Methanol (2:1, v/v) und Auftrennung der Extrakte mittels HPTLC-Platten bestimmt. Mobile Phase war n-Hexan/ n-Heptan/ Diethylether/ Essigsäure = 63/18,5/18,5/1; v/v. Zur densitometrischen Bestimmung wurde die Methode nach Halpaap (1978) eingesetzt, wobei Cholesterinformiat als interner Standard zur Ausbeutekontrolle der Aufarbeitungsschritte verwendet wurde. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes.

#### **4.5 Bildung von ApoE- und Cholesterin-reichen HDL-Partikeln durch Cholesterin-beladene Makrophagen**

##### **4.5.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Die Inkubation von Cholesterin-beladenen Maus-Peritoneal-Makrophagen in Gegenwart von apoE-armen HDL-Partikeln führt zur Ausschleusung von Cholesterin aus den Zellen und zur Bildung von apoE- und Cholesterin-reichen HDL-Partikeln, die wegen ihrer Fähigkeit, an Heparin-Sepharose zu binden, aus dem Kulturmedium isoliert und durch Bestimmung des Protein- und Cholesteringehaltes quantifiziert werden können. Bei Verwendung von radioaktiv markiertem Cholesterin zur Beladung der Makrophagen und Präinkubation der Zellen in Gegenwart von  $^{35}\text{S}$ -Methionin läßt sich der Test empfindlicher gestalten.

In Gegenwart von Substanzen, die die Sekretion von apoE- und die Cholesterin-Ausschleusung fördern, werden mehr apoE- und Cholesterin-reiche HDL-Partikel gebildet. Solche Substanzen könnten über eine Stimulierung des "reverse cholesterol transport" zurück zur Leber antiatherosklerotische Eigenschaften haben und zur Prävention und Therapie der Hyperlipidämie-induzierten Atherosklerose eingesetzt werden.

##### **4.5.2 Material und Methoden**

###### **4.5.2.1 Zellen**

Folgende Makrophagen-ähnlichen bzw. monozytären Zelllinien wurden bei der "American Type Culture Collection (ATCC)" bezogen, in unserer Zellkultur etabliert und auf ihre Eignung hin geprüft, Mausperitonealmakrophagen bei Untersuchungen zur Bildung und Sekretion von apoE- und Cholesterin-reichen HDL zu ersetzen:

Bezeichnung	Bestellnummer	Spezies
IC21	TIB 186	Maus
J774A.1	TIB 67	Maus
P388D <sub>1</sub>	TIB 63	Maus
PU5-1R	TIB 61	Maus
WEHI-3	TIB 68	Maus
U937	CRL1593	Mensch

Die Zellen sind in 10 %igem DMSO in Kulturmedium bei -196 °C mit unbekannter Passagenzahl kryokonserviert.

Darüber hinaus fanden frisch angelegte Primärkulturen von Peritonealmakrophagen der Maus Verwendung.

#### 4.5.2.2 Kulturmedium und Puffer

##### a) Kulturmedium, Medienadditiva und Antibiotika :

1. Minimum Essential Medium, nach Dulbecco (DMEM, Boehringer Mannheim Nr. 210048)
2. Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ , Merck Nr. 6323)
3. Streptomycinsulfat (Serva, Nr. 35500)
4. Penicillin G-Kaliumsalz (Serva, Nr. 31749)
5. Fötale Kälberserum (FKS, Seromed, verschiedene Chargen)
6. Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA, 100fach konzentriert, Boehringer Mannheim, Nr. 210293)
7. Natriumpyruvat (Seromed, Nr. L0473)
8. L-Glutamin (Boehringer Mannheim, Nr. 210277)
9. Rinderserumalbumin (BSA, Sigma A7906)

DMEM Pulverkonzentrat (für 5 l Medium)

+ 18,5 g  $\text{NaHCO}_3$

+ 0,5 g Streptomycinsulfat

+ 0,3 g Penicillin G (500.000 IU)

werden mit bidestilliertem Wasser auf 5 l aufgefüllt und nach 15-30minütigem Rühren sterilfiltriert (Filter 0,2  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schüll, Nr. 401352).

Die NEAA , Natriumpyruvat und L-Glutaminlösungen werden vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Das FKS wird zur Inaktivierung von Proteasen zwei Stunden bei 56 °C hitzeinaktiviert und vor Gebrauch 10 %ig (v/v) dem Flüssigmedium zugesetzt.

BSA wird als sterile 10 %ige Stammlösung in bidest. Wasser bei 4 °C gelagert und dem Flüssigmedium vor Gebrauch zugesetzt.

Als DMEM-Medium wird grundsätzlich das Nährmedium einschließlich  $\text{NaHCO}_3$ , NEAA, L-Glutamin, Natriumpyruvat und Antibiotika bezeichnet. Alle anderen Zusätze (FKS, BSA, acetyliertes LDL) werden gesondert aufgeführt.



*b) Zusammensetzung des PBS-Puffers*

Zum Waschen der Zellen wird "phosphate buffered saline" (PBS) verwendet:

8,0 g NaCl (Merck, Nr. 6404)

0,2 g KCl (Merck, Nr. 4936)

1,15g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, Nr. S0876)

0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Nr. 4873)

werden mit bidest. Wasser auf ein Liter aufgefüllt - der pH-Wert der Lösung beträgt 7,0.

*4.5.2.3 Subkultivierung der Makrophagen-Zelllinien*

Alle im folgenden beschriebenen Arbeitsgänge erfolgen unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank, sterile Verbrauchsware, Pipetten) :

1. Medium absaugen (bei der in Suspension kultivierten U937-Zelllinie nach Zentrifugation bei 2.000 Upm (Labofuge 6000, Heraeus))
2. 3 ml PBS-Puffer zusetzen (bei NUNC-Petrischalen, d=10 cm, Nr. 150350)
3. Die Zellen mittels sterilem Gummiwischer vorsichtig abschaben (entfällt bei der U937-Zelllinie)
4. Zentrifugation der Zellsuspension bei 2.000 Upm (Labofuge 6000, Heraeus), 1 Minute
5. Absaugen des Überstandes, suspendieren des Zellpellets in 5 ml DMEM/10 % FKS
6. Zentrifugation wie 4.
7. Überstand absaugen, Zellpellet in 5 ml DMEM/10 % FKS aufnehmen und auf fünf neue Petrischalen verteilen, in denen 10 ml DMEM/10 % FKS vorgelegt wurden.

*4.5.2.4 Einfrieren der Makrophagen-Zelllinien*

Punkt 1. - 6. wie unter 4.5.2.3 beschrieben. Dann weiter:

7. Pellet suspendieren in 1 ml DMEM/10 % FKS/10 % DMSO und in eine Ampulle (NUNC, Nr. 363401) pipettieren
8. Mit Einfrierstopfen (Union Carbide) auf Position "G" 2 h im Stickstoffbehälter belassen, danach alle 15 min eine Position tiefer setzen

#### **4.5.2.5 Isolierung von Peritonealmakrophagen der Maus**

Für die Isolierung von Peritonealmakrophagen zur Herstellung von Primärkulturen werden NMRI-Mäuse (männlich, ca. 20 g; Züchter Hagemann) verwendet.

Nach dem Töten der Maus in Etherdampf wird diese mit ausgestreckten Extremitäten auf einer Unterlage befestigt. Die Bauchhaut wird mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und anschließend vom Brust- bis zum Bauchraum abpräpariert, ohne die darunterliegende Muskulatur zu verletzen. In den inneren Bauchraum werden 4 ml 0,9 %ige NaCl + 0,5 E Liquemin (Hoffmann LaRoche) steril injiziert, ohne Organe zu verletzen. Der Bauchraum wird massiert, dann die Muskelschicht abgehoben, etwas eingeschnitten und die NaCl-Lsg. mit den Zellen mit einer sterilen Pasteurpipette aufgesogen und in ein steriles Röhrchen überführt.

Die Peritonealspülungen von 3 Mäusen werden in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt, 5 min bei 2.000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen werden in DMEM/10 % FKS resuspendiert (1 ml Medium/Röhrchen) und auf die entsprechenden Multischalen verteilt. Es werden jeweils die Zellen von 2 Mäusen auf einer Multischaleneinheit (Nunc, Nr. 150229) zusammengefaßt (Konzentration der Zellen ca.  $1 - 3 \times 10^6$  Zellen/Einheit).

#### **4.5.2.6 Präparation von humanen Low-High-Density Lipoproteinen (LDL/HDL<sub>3</sub>)**

Human-Vollblut der Blutbank Köln (Antikoagulanzen: Citrat) wird in einer Laborzentrifuge (Labofuge 6000, Heraeus) 15 min bei 3.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand (Citrat-Plasma) wird mit Kaliumbromid (KBr, Merck, Nr. 4905) auf eine Dichte von 1,02 g/ml eingestellt und wie folgt zentrifugiert: Ultrazentrifuge L8-70M und 70Ti-Rotor, Quickseal-Röhrchen, Fa. Beckman, 16 h, 65.000 Upm, die Trennung erfolgt bei 4 °C.

Es werden 10 ml Überstand (VLDL, Chylomikronen) mittels Pasteurpipette abgenommen und verworfen.

Die untere Phase wird mit KBr auf eine Dichte von 1,063 g/ml eingestellt und erneut unter oben beschriebenen Bedingungen

zentrifugiert. Die oberen 5-8 ml (je nach LDL-Gehalt des Plasmas) werden mittels Pasteurpipette abgenommen und nach der Dialyse gegen unten aufgeführten Puffer zur Acetylierung (4.5.2.7) eingesetzt.

Die untere Phase wird mit KBr auf eine Dichte von 1,125 g/ml eingestellt und erneut unter oben beschriebenen Bedingungen - jedoch mindestens 36 h lang - zentrifugiert. Die oberen 5-8 ml (je nach HDL<sub>2</sub>-Gehalt des Plasmas) werden mittels Pasteurpipette abgenommen und verworfen.

Die untere Phase wird mit KBr auf eine Dichte von 1,21 g/ml eingestellt und erneut unter den bei der HDL<sub>2</sub>-Abtrennung beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Die oberen 5-8 ml (je nach HDL<sub>3</sub>-Gehalt des Plasmas) werden mittels Pasteurpipette abgenommen und gegen folgenden Puffer dialysiert:

36,0 g Natriumchlorid (NaCl, Merck Nr. 6404)  
1,5 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Sigma, Nr. ED2SS)  
1,2 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Sigma Nr. S0876)  
werden mit vorgekühltem (4 °C) bidest. Wasser auf 4 l aufgefüllt (pH 7,2).

Der Dialysepuffer wird jeweils frisch angesetzt, wobei für 100 ml HDL<sub>3</sub>-Präparation achtmal 4 l Dialysepuffer eingesetzt werden; die Dialyse erfolgt über insgesamt 2 Tage. Es wird ein Dialyseschlauch mit einer Ausschlußgrenze von 10.000 g/mol (Serva, Nr. 44110) verwendet.

Nach einer Proteinbestimmung nach Lowry wird das HDL<sub>3</sub> sterilfiltriert (0,2 µm Einwegfilterhalter, Sartorius, Nr. 16534K); die maximale Haltbarkeit beträgt 8 Wochen.

#### **4.5.2.7 Herstellung von acetylierten LDL**

1 ml LDL-Lösung (10-16 mg Protein/ml) und 1 ml kaltgesättigte Natriumacetatlösung werden im Eisbad gerührt, wobei darauf geachtet wird, daß die gesamte Lösung ständig in Bewegung ist.

Acetanhydrid wird langsam (etwa 3 µl/5 min) zugetropft, wobei die benötigte Menge nach folgender Regel ermittelt wird:

mg LDL-Protein x 1,5 = µl Acetanhydrid.

Nach Zugabe des gesamten Acetanhydrids wird die gesamte Lösung noch weitere 30 min gerührt.

Über Nacht wird gegen

0,9 % NaCl

0,3 mmol/l EDTA (pH 7,4) bei 4 °C dreimal dialysiert.

Zur Kontrolle wird anschließend eine Agarose-Elektrophorese durchgeführt. Bei erfolgreicher Acetylierung der LDL kann die Proteinbande der acetylierten LDL bei einem höheren  $R_f$ -Wert (etwa auf der Höhe der HDL) lokalisiert werden. Andernfalls schmiert die Bande vom Start an, was auf eine Denaturierung der LDL hinweist.

In einigen Experimenten wurden die acetylierten LDL mit  $^3\text{H}$ -Cholesterinoleat markiert.

Dazu wird eine toluolische Lösung des markierten Esters (DuPont, Nr. NET-746) in einem Sovirell-Reagenzglas unter Stickstoffgasstrom und leichtem Drehen abgeblasen. Anschließend werden pro 2 kBq  $^3\text{H}$ -Cholesterinester 0,1 mg Acetyl-LDL (Bezugsgröße: Protein nach Lowry) zugesetzt und nach Inkubation unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur über Nacht zweimal gegen die oben aufgeführte NaCl-Lösung dialysiert.

#### 4.5.2.8 Präparation von apoE-armen HDL<sub>3</sub>

Als Cholesterinakzeptor werden apoE-arme HDL<sub>3</sub> eingesetzt:

##### a) Puffer (pH 7,4) zur Präparation von apoE-armen HDL<sub>3</sub>:

Puffer 1: 0,05 mol/l NaCl (Merck, Nr. 6404),  
0,025 mol/l MnCl<sub>2</sub> (Sigma, Nr. M3634),  
5 mmol/l Natriumacetat (Merck, Nr. 6720)  
Puffer 2: 0,29 mol/l NaCl, 5 mmol/l Natriumacetat

##### b) Vorbereitung und Durchführung der Säulenchromatographie:

Heparin-Sepharose (Pharmacia, Nr. 17-0467-01) wird in "Puffer 1" gequollen (5 g Trockensubstanz ergaben 15 ml Gel), in eine Säulenvorrichtung (Pharmacia, Nr. 19-0870-01) gefüllt und mit 150 ml "Puffer 1" äquilibriert. Die dafür eingesetzte Schlauchpumpe (Pharmacia, Modell 2132-002) wird mit einem Flow von 30 ml/h betrieben. Die HDL<sub>3</sub>-Fraktion wird zweimal gegen je 1 l "Puffer 1" dialysiert,

und ca. 10 mg HDL-Protein werden in diesem Puffer über Nacht mit einer Flußrate von 10 ml/h über die Säule zirkuliert. Die nicht gebundene Fraktion (apoE-arme HDL<sub>3</sub>) wird gegen den unter 4.5.2.2.5 beschriebenen Dialysepuffer dreifach dialysiert und mittels Ultrafiltration (Fa. Amicon, Minicon-Zellen Typ B15) auf einen Proteingehalt von ca. 10 mg/ml aufkonzentriert.

Die Heparinsäule wird nach Regenerierung mit 200 ml Puffer 2" und anschließender Äquilibrierung gegen "Puffer 1" weitere viermal eingesetzt.

#### 4.5.2.9 Zellproteinbestimmung nach Lowry

##### Lösungen:

Reagenz A:	2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,1 mol/l NaOH
Reagenz B:	1 % Kalium-Natrium-Tartrat 0,5 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ einzeln lösen, dann zusammengeben
Reagenz C:	50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B

##### Prüflösung:

100 µl Probe mit 2 ml Reagenz C gut mischen und 10 min stehen lassen,  
100 µl Folin-Reagenz (Fa. Merck, Nr. 9001) zugeben, gut mischen und 30 min stehen lassen,  
100 µl Triton-X-100 (1 %ig in dest. Wasser) zugeben.  
Absorptionsbestimmung gegen Reagenz + Folin + Triton als Leerwert im Spektralphotometer (Beckman, Modell 34) - Wellenlänge: 660 nm

##### Eichlösung:

0,1 % BSA-Lsg.  
10-50 µl = 10 - 50 µg BSA/Ansatz

#### 4.5.2.10 Isolierung apoE-reicher Sekretionsprodukte

##### a) Puffer (pH 7,4) zur Isolierung apoE-reicher Lipoproteine :

Puffer 1: 0,05 mol/l NaCl (Merck, Nr. 6404),  
0,025 mol/l  $\text{MnCl}_2$  (Sigma, Nr. M3634),  
0,005 mol/l Natriumacetat (Merck, Nr. 6720)

Puffer 2: 0,095 mol/l NaCl,  
          0,005 mol/l Natriumacetat  
Puffer 3: 0,025 mol/l  $MnCl_2$ ,  
          0,005 mol/l Natriumacetat

*b) Vorbereitung und Durchführung der Isolierung:*

5 U Heparin-Sepharose (Pharmacia, Nr. 17-0467-01) werden in 100 ml "Puffer 1" über Nacht gequollen.  
500 µl dieser Sepharose-Suspension werden mit 500 µl Medium und 5 ml "Puffer 3" über Nacht in Plastikröhrchen (Sarstedt, Nr. 55.473) bei 4 °C inkubiert. Die nicht gebundenen Mediumbestandteile werden durch zweimaliges Waschen mit je 2 ml "Puffer 1" nach jeweiliger Abzentrifugation (2.000 Upm, Heraeus-Zentrifuge Labofuge 6000) des Sepharosegels entfernt. Die apoE-haltigen Sekretionsprodukte der Zellen werden anschließend vom Gel durch zweimalige Extraktion mit je 1 ml "Puffer 2" eluiert.

*4.5.2.11 Proteinbestimmung nach Bradford*

500 µl des Heparin-Sepharose-Eluats werden mit 2 ml 1:4 verdünntem Bradfordreagenz (Biorad, Nr. 500-0006) 10 min inkubiert und die Absorption im Spektralphotometer (Beckman, Modell 34) bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

Eichlösung:

0,1 % BSA-Lösung in Puffer 2 (s. 4.5.2.10)  
2-20 µl = 2 - 20 µg BSA/Ansatz

*4.5.2.12 HPTLC-Bestimmung von Cholesterin und Cholesterin-ester*

Die getrockneten Extrakte aus dem Zellhomogenat bzw. apoE-haltige Zellkulturüberstände werden in 30 µl Chloroform aufgenommen und davon jeweils 0,5 µl mit dem Nanomat (Fa. Camag) mittels 0,5 µl-Kapillaren auf HPTLC-Fertigplatten (Platten Kieselgel 60, 20x10 cm, Fa. Merck) in einem Abstand von 0,5 cm aufgetragen. Die HPTLC-Platten läßt man zuvor in dem Laufmittel n-Hexan, n-Heptan, Diethylether, Eisessig (63:18,5:18,5:1,5 v/v) zur Reinigung vorlaufen, anschließend 1 h bei 100 °C aktivieren und vor Auftragen der Proben wieder auf Raumtemperatur abkühlen.

Als Eichlösung wird eine Mischung aus Cholesterin, Cholesterinester und Cholesterinformiat in einem Bereich von 0,0125-0,2 µg aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt in einer Linear-kammer mit 4 ml Laufmittel (s.o.) für 10 min. Nach Trocknung der Platte für 10 min bei 100 °C werden die aufgetrennten Komponenten durch Eintauchen (10 sec) in unten aufgeführtem HPTLC-Tauchbad und Entwicklung im Trockenschrank für 20 min bei 105 °C sichtbar gemacht.

HPTLC-Tauchbad:

3,2 g  $\text{MnCl}_2$   
480 ml Methanol  
480 ml Aqua dest.  
32 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  konz.

Nach Abkühlung der Platten wird die Masse der Komponenten durch Fluoreszenz-Densitometrie (Anregungswellenlänge 366 nm, Emissionswellenlänge 510 nm) mit einem Dünnschicht-Scanner (Fa. Camag) und Auswertung der Peak-Flächen mit dem Integrator SP 4100 (Spectra Physics) bestimmt.

**4.5.2.13 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

a. Zusammensetzung des Trenngels:

Lösung A:

24,3 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan  
8,2 g Natriumacetat  
3,7 g Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)  
mit Essigsäure auf pH = 7,4 einstellen und mit bidest.  
Wasser auf 500 ml auffüllen.

Lösung B:

40 g Acrylamid  
1,5 g N,N'-Methylenbisacrylamid  
mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

Lösung C:

2 g Natriumdodecylsulfat  
mit bidest. Wasser auf 10 ml auffüllen.

Lösung D:

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TMED)

#### Lösung E:

1,5 g Ammoniumperoxodisulfat  
mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

Die Trenngelmischung wird wie folgt hergestellt:

6 ml Lösung A  
15 ml Lösung B  
3 ml Lösung C  
0,2 ml Lösung D  
3 ml Lösung E werden mit bidest. Wasser auf 60 ml  
aufgefüllt.

Die Lösung polymerisiert in einer Kassette (LKB 2117-204 Polymerisationskassette), pro Platte können 20 Proben à 10 µl aufgetragen werden. Die Proteinkonzentration der Proben liegt im Bereich 1 bis 10 µg/µl.

#### b) Elektrodenpuffer

200 ml Lösung A (s.o.)  
1800 ml bidest. Wasser  
4 g Natriumdodecylsulfat  
Pro Pufferkammer (LKB-Multiphor-System) werden 1000 ml des Elektrodenpuffers benötigt.

#### c. Probenpuffer

6 ml Lösung A  
3 ml Lösung C mit bidest. Wasser auf 20 ml auffüllen.

Zur reduktiven Proteinspaltungen wird dem Probenpuffer zusätzlich 5 %ig β-Mercaptoethanol zugesetzt.

#### d. Färbereagenz

2,5 g Coomassieblau G250  
90 ml Essigsäure  
500 ml Methanol  
410 ml bidest. Wasser

#### e. Fixierbad

250 g Trichloressigsäure mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen.



#### f. Entfärber

700 ml dest. Wasser  
200 ml Methanol  
100 ml Essigsäure

#### g. Durchführung der elektrophoretischen Trennung:

Das Probenmaterial wird 5 min bei 90-95 °C (Wasserbad) mit Probenpuffer behandelt (verschlossenes Eppendorf-Reaktionsgefäß, Proteinkonzentration der Probe ca. 10 µg; exakte Proteinbestimmung wegen SDS-Gehalt des Puffers jedoch unmöglich!). Die elektrophoretische Trennung erfolgt nach Zentrifugation aus dem Überstand.

Die Trennung wird bei einer Feldstärke von 5-6 V/cm durchgeführt.

Laufzeit: 4 Stunden (max. 5 Stunden)

Als Frontmarker wird einer Probe Bromphenol zugesetzt.

Nach der Trennung wird die Platte 16 h fixiert, 2 h gefärbt und anschliessend mittels 2 x 0,5 l Entfärberlösung entfärbt. Die Laufstrecken der angefärbten Proteinbanden werden mit dem Lineal bestimmt.

#### h. Molmassenmarker-Kit (Fa. Pharmacia):

Markerprotein	M(X)
Phosphorylase b	94.000
Albumin	67.000
Ovalbumin	43.000
Anhydrase	30.000
Trypsin Inhibitor	20.100
Lactalbumin	14.400

#### **Auswertung:**

Die Laufstrecken der Markerproteine werden mit den Logarithmen der bekannten Molmassen mittels linearer Regressionsanalyse ausgewertet. Aus der erhaltenen Eichgeraden werden mit Hilfe der Laufstrecken der sezernierten Produkte deren Molmassen bestimmt.

#### 4.5.2.14 Versuchsdurchführung

Mausperitonealmakrophagen bzw. die entsprechende Makrophagen-ähnliche Zelllinie werden in 6er Multischalen (Nunc, Nr. 150229) in DMEM/10 % FKS angezüchtet. Nach 24 h wird der konfluente Monolayer mit PBS-Puffer gewaschen und mit DMEM/0,025 % BSA/50 µg/ml Acetyl-LDL/ 370 kBq/ml  $^{35}\text{S}$ -Methionin (DuPont, Nr. NEG-009A) 24 h beladen. Die Zellen werden mittels sterilem Gummiwischer abgenommen, mit PBS-Puffer gewaschen, wieder auf Multischalen verteilt (in DMEM/0,025 % BSA) und 8 h zum Anheften inkubiert.

Zum eigentlichen Efflux-Experiment wird mit folgendem Akzeptor-Medium 16 h inkubiert: DMEM/ 0,025 % BSA/ 200 µg/ml apoE-armes HDL<sub>3</sub> und Prüfsubstanzen (in Ethanol gelöst, wobei die Lösungsmittel-Endkonzentration 1 % beträgt).

Zellen und Medium werden abgenommen und nach Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation (2.000 Upm, Heraeus Labofuge 6000) wie folgt aufgearbeitet:

Die pelletierten Zellen werden in 500 µl PBS-Puffer aufgenommen und zweimal je 10 sec bei 30 W ultrabeschallt. Ein 100 µl-Aliquot dient der Proteinbestimmung nach Lowry (4.5.2.9). Weitere 300 µl des Homogenates werden mit 1 ml bidest. Wasser und 3 ml Chloroform/Methanol 2 + 1 (Lichrosolv, Fa. Merck, unter Zusatz von 30 µl einer ethanolischen Lösung von Cholesterinformiat,  $c = 0,4 \text{ mg/ml}$ , als interner Standard) versetzt und extrahiert. Nach Abnahme der unteren organischen Phase wird der Extraktionsschritt mit 2 ml Chloroform/Methanol 2 + 1 (ohne Zusatz) wiederholt. Die vereinigten organischen Phasen werden unter Stickstoffgasstrom abgeblasen und der Gehalt an Cholesterin/Cholesterinester wie unter 4.5.2.12 beschrieben bestimmt.

Von 500 µl Medium wird zur Bestimmung des Efflux von apoE-haltigen Lipid-Protein-Komplexen eine Abtrennung derselben nach 4.5.2.10 durchgeführt. Die Radioaktivität von 200 µl Eluat (Heparin-gebundenes  $^3\text{H}$ -Cholesterin bzw.  $^{35}\text{S}$ -markierte Proteine) wird dabei im Betazähler (LKB, Modell 1219) mit einem Dual-Meßprogramm für  $^3\text{H}/^{35}\text{S}$  bestimmt. Die Menge Heparin-gebundener Proteine wird nach 4.5.2.11 in 500 µl Eluat gemessen. 500 µl Heparinsepharose-Eluat werden analog zu dem

bei Zellen angewandten Verfahren extrahiert und der Lipidgehalt mittels HPTLC-Methode (4.5.2.12) bestimmt. Zum Nachweis und zur Quantifizierung apoE-ähnlicher\* Sekretionsprodukte werden 500 µl Medium lyophilisiert und mit dem unter 4.5.2.13 vorgestellten Verfahren elektrophoretisch aufgetrennt. Die im Elektropherogramm auftretende Bande bei einer Molmasse von 35.000 g/mol wird ausgestanzt und die Radioaktivität (<sup>35</sup>S-markierte Proteine) im Szintillationszähler (s.o.) bestimmt.

#### **4.5.3 Ergebnisse und Diskussion**

Inkubiert man mit Cholesterin-beladene Maus-Peritonealmakrophagen in Gegenwart von HDL, so nimmt der zelluläre Cholesterin-Gehalt stärker ab, wenn man dem Inkubationsmedium einen ACAT-Inhibitor zusetzt (Schmitz et al., 1985). Diesem Test liegt eine Erhöhung der HDL-Rezeptordichte (Kap. 4.7) und ein verstärkter Abtransport des Cholesterins durch HDL<sub>3</sub>-Partikel zugrunde.

Um zu demonstrieren, daß unter diesen Versuchsbedingungen nicht nur verstärkt Cholesterin aus den Makrophagen ausgeschleust wird, sondern daß die Makrophagen zusätzlich größere Mengen Apolipoprotein E synthetisieren, das dann mit den HDL-Partikeln assoziiert wird, wurden frisch gewonnene Maus-Peritonealmakrophagen mittels Acetyl-LDL mit radioaktiv markiertem Cholesterin beladen. Nach Inkubation dieser Zellen mit ApoE-armen HDL-Partikeln - diese binden unter den gewählten Bedingungen nicht an Heparin-Sepharose - wurden die Lipoproteine hoher Dichte an einer Heparin-Sepharose-Säule fraktioniert (Weisgraber et al., 1980) und der Proteingehalt und der Gehalt an radioaktiv markiertem Cholesterin in den an Heparin-Sepharose bindenden HDL-Partikeln (= ApoE-reiche HDL) bestimmt.

Die Abbildungen 4.20 und 4.21 zeigen, daß die Inkubation dieser Zellen in Gegenwart des ACAT-Inhibitors Octimibat zu einer dosisabhängigen Zunahme der ApoE-reichen HDL-Partikel -

---

\* Der Begriff "apoE-ähnlich" wird verwendet, da kein unumstößlicher Beweis erbracht worden ist, daß es sich bei diesem Protein mit dem Molekulargewicht von  $M_r = 35.000$  um ApoE handelt (siehe Seite 370).

bestimmt anhand des Proteingehaltes - und des Gehaltes dieser Lipoproteine an radioaktiv markiertem Cholesterin führt.

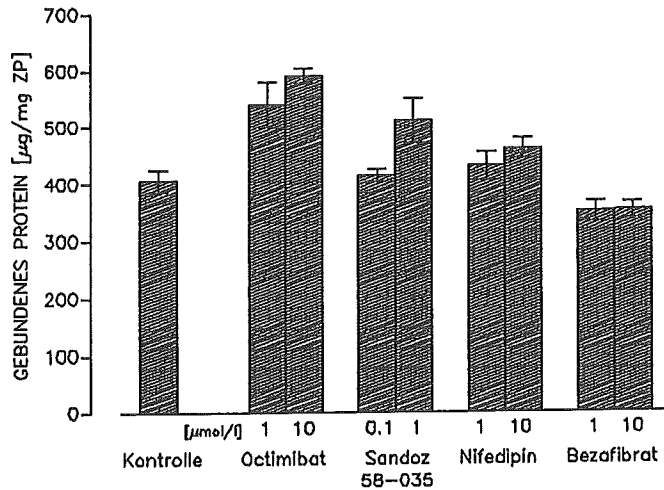


Abb. 4.20: HDL-assoziierte, an Heparin-Sephrose bindende Proteine

Residente Peritonealmakrophagen aus Mäusen wurden mit PBS-Puffer, welcher 0,5 U/ml Heparin enthält, gewaschen und in DMEM, welches 0,1 % BSA und 740 kBq/ml  $^{35}\text{S}$ -Methionin enthält, für 20 h in einem Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde gegen DMEM, welches 50 µg/ml acetyliertes- $^3\text{H}$ -LDL enthält (0,376 µmol Cholesterinester (0,23 kBq) und 0,156 µmol Cholesterin (12,4 kBq)), ausgetauscht und die Inkubation für weitere 20 h fortgesetzt. Die Zellen wurden intensiv gewaschen und 20 h mit DMEM/ 0,025 % BSA kultiviert. Während der dann folgenden 16stündigen Efflux-Phase wurden dem Medium zusätzlich 200 µg/ml ApoE-arme HDL und die angegebenen Substanzen zugesetzt. Zur weiteren Aufarbeitung (s. unten) wurden die Efflux-Medien steril entnommen. Die Zellen wurden mittels Gummischer abgeschabt, mit PBS-Puffer gewaschen und mittels Ultraschall homogenisiert. Das Zellprotein wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt.

Zur Quantifizierung des an Heparin-Sephrose bindenden Materials wurden 2 ml des Efflux-Mediums bei einer Dichte von 1,21 g/ml zur Rückgewinnung der HDL-Fraktion ultrazentrifugiert, dialysiert und mit 100 mg Heparin-Sephrose bei 4 °C in 5 mmol/l Natriumacetatpuffer (pH 7,4), welcher 50 mmol/l Natriumchlorid und 25 mmol/l Mangan-II-chlorid enthält, für 16 h inkubiert. Das Sepharosematerial wurde anschliessend mit demselben Puffer gewaschen, und die ApoE-haltigen Lipoproteine wurden zweimal mit je 1 ml eines 5 mmol/l Natriumacetat-Puffers unter Zusatz von 0,095 mol/l Natriumchlorid extrahiert. Der Proteingehalt der vereinigten Extrakte wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes; (ZP = Zellprotein).

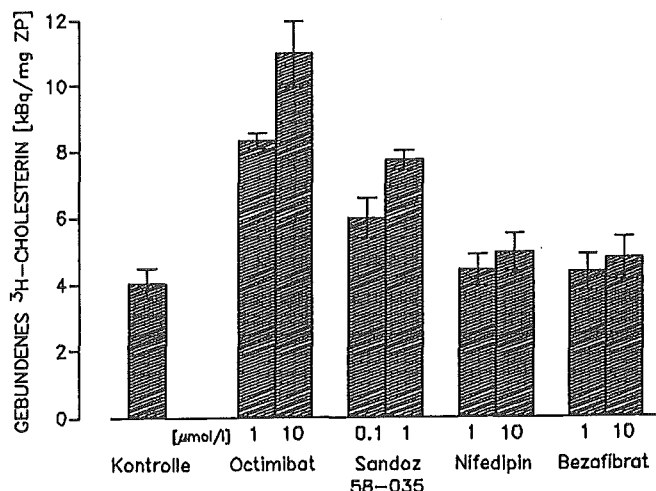


Abb. 4.21: HDL-assoziertes, an Heparin-Sepharose bindendes <sup>3</sup>H-Cholesterin. Inkubationen und Präparation des an Heparin-Sepharose gebundenen Materials wurden, wie in der Legende zu Abb. 4.20 beschrieben, durchgeführt. Die <sup>3</sup>H-Cholesterin-Radioaktivität wurde in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1219) mit einem implementierten Zählprogramm für Doppelmarkierungen quantifiziert. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes.

Dieses Ergebnis konnte bestätigt werden durch Untersuchung der Verdrängungseigenschaften dieser durch Inkubation mit den Cholesterin-beladenen Makrophagen und dem ACAT-Inhibitor gewonnenen HDL-Partikeln am B/E-Rezeptor (LDL-Rezeptor) von HepG2-Zellen. Bekanntlich bindet der hepatische LDL-Rezeptor nicht nur ApoB-haltige Partikel (LDL) sondern - sogar mit höherer Affinität - ApoE-haltige Partikel, so daß es zu einer Konkurrenz zwischen LDL und ApoE-reichen HDL am LDL-Rezeptor kommt.

Die Messung des <sup>35</sup>S-Methionin-Einbaus in den an Heparin-Sepharose bindenden Proteinanteil (Abb. 4.22) und die Bestimmung des Cholesterin-Gehaltes in den an Heparin-Sepharose bindenden Lipoproteinen anhand einer Massenbestimmung (Abb. 4.23) bestätigen die erzielten Ergebnisse. Die als Referenzsubstanzen eingesetzten Verbindungen Sandoz 58-035,

Nifedipin und Bezafibrat zeigten unter diesen Bedingungen nur einen geringen oder keinen Effekt.

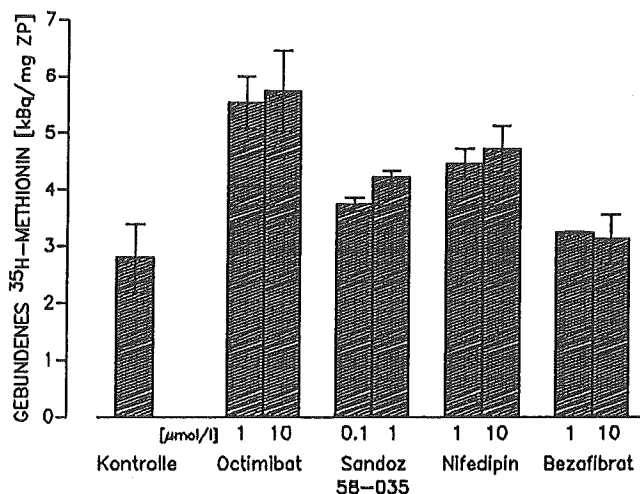


Abb. 4.22: HDL-assoziertes, an Heparin-Sepharose bindendes  $^{35}\text{S}$ -Methionin.

Inkubationen und Präparation des an Heparin-Sepharose gebundenen Materials wurden, wie in der Legende zu Abb. 4.20 beschrieben, durchgeführt.

Die  $^{35}\text{S}$ -Methionin-Radioaktivität wurde in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1219) mit einem implementierten Zählprogramm für Doppelmarkierungen quantifiziert.

Angabe sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes.

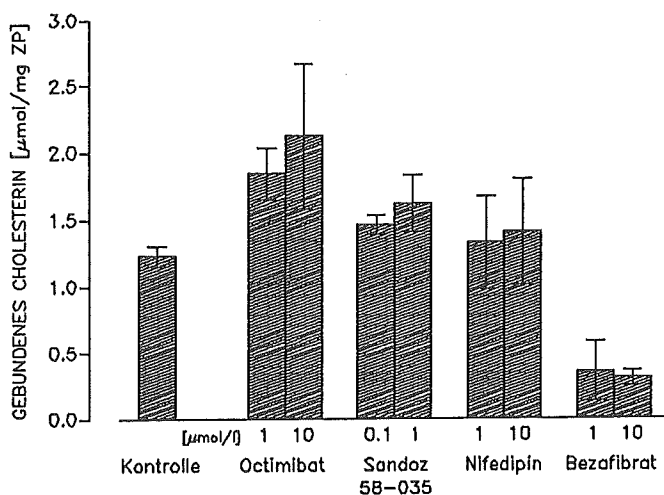


Abb. 4.23: HDL-assoziiertes, an Heparin-Sepharose bindendes Gesamtcholesterin.

Inkubationen und Präparation des Heparin-Sepharose gebundenen Materials wurden, wie in der Legende zu Abb. 4.20 beschrieben, durchgeführt.

Das Gesamtcholesterin wurde nach Extraktion von 500 µl der gebundenen Lipoproteine mit 3 ml Chloroform/ Methanol (2:1; v/v) und Auftrennung der Lipide auf HPTLC-Platten (mobile Phase: n-Hexan/n-Heptan/ Diethylether/Essigsäure = 63/18,5/18,5/1; v/v) bestimmt. Die densitometrische Auswertung erfolgte nach Halpaap (1978), wobei Cholesterinformiat als interner Standard zur Ausbeutekontrolle der Extraktionsschritte eingesetzt wurde.

Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung vom Mittelwert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten darauf hin, daß der normalerweise physiologisch ablaufende Prozess der Ausschleusung von Cholesterin aus peripheren Zellen über HDL<sub>3</sub>-Partikel, die dann nach Assoziation mit ApoE und Phospholipiden der Makrophagen und Umbauprozessen, an denen auch das plasmatische Enzym Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) beteiligt ist, zu HDL<sub>2</sub>-Partikeln werden, in Gegenwart von ACAT-Inhibitoren in verstärktem Umfang abläuft. Somit erweitern diese Untersuchungen die Kenntnisse über Substanzen, die in dem Testsystem "Cholesterin-Einschleusung und Cholesterin-Veresterung in Makrophagen" gefunden worden sind, und machen wahrscheinlich, daß in vitro aktive Substanzen

auch in vivo wirksam sein dürften, wenn sie den Zielort erreichen.

Um Hinweise darauf zu bekommen, daß die an Heparin-Sepharose-bindenden HDL-Partikel tatsächlich größere Mengen ApoE enthalten, wurden diese Lipoproteine delipidiert und die Proteine einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterworfen. Dabei konnte eine  $^{35}\text{S}$ -Methionin-haltige Proteinbande nachgewiesen werden, die aufgrund des Molekulargewichtes von  $M_r = 35.000$  dem Apolipoprotein E zugeordnet werden muß. Bei Inkubation der Cholesterin-beladenen Makrophagen in Gegenwart von ACAT-Inhibitoren konnte eine höhere Radioaktivität gefunden werden, die den stimulierenden Effekt dieser Substanzen auf die ApoE-Sekretion zu bestätigen scheint. Da aber bislang noch kein unumstößlicher Beweis erbracht worden ist, daß es sich bei dem an Heparin-Sepharose-bindenden Protein um ApoE handelt, soll im folgenden von einem "ApoE-ähnlichen Protein" gesprochen werden.

Ein weiteres Ziel der im Projektzeitraum durchgeführten Untersuchungen war es, die Maus-Peritonealmakrophagen möglichst durch eine permanente Makrophagen-Zelllinie zu ersetzen. Zur Realisierung eines In-vitro-Modells, welches Aussagen über den "reverse cholesterol transport" erlaubt, muß eine solche Zelllinie über einen sogenannten "scavenger receptor", welcher die Aufnahme chemisch modifizierter LDL-Partikel in die Zelle vermittelt, und über eine intakte Synthese des Apolipoproteins E verfügen, dem eine maßgebliche Rolle beim Rücktransport des Cholesterins aus der Peripherie zur Leber zukommt (Koo et al., 1985). Da für literaturbekannte Makrophagen-Zelllinien noch keine Daten zu dieser speziellen Fragestellung vorliegen, wurden die bei uns etablierten Makrophagen-Zelllinien U937, P388D<sub>1</sub>, IC21, PU5-1R und WEHI-3 untersucht und die erzielten Ergebnisse mit den an Peritonealmakrophagen gefundenen verglichen.

Bei diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die humane histiozytäre Lymphoma-Zelllinie U937 zwar ApoE synthetisiert und sezerniert, aber eine Stimulation dieser Eigenschaft unter Cholesterinbeladung mit acetyliertem LDL (acLDL) nicht nachweisbar war. Bestimmungen des zellulären Cholesterin- und Cholesterinester-Gehaltes zeigten keine Zunahme die-



ser Parameter unter acLDL, was den Schluß zuläßt, daß acLDL von dieser Zelllinie nicht aufgenommen wird und somit das freigesetzte Cholesterin regulatorisch nicht tätig werden kann. Auch wenn man diese Zellen mittels DMSO oder Phorbol-estern zu Makrophagen-ähnlichen Zellen zu differenzieren versucht (Myers et al., 1984), werden diese Zelleigenschaften nicht beeinflußt.

Die Maus-Makrophagen-ähnlichen Zelllinien P388D<sub>1</sub> und IC21 lassen sich zwar gut und im Ausmaß mit Peritonealmakrophagen vergleichbar mit chemisch modifiziertem LDL beladen, sezernieren jedoch ApoE nur in geringer Menge und vom Beladungszustand unabhängig.

Für die beiden Maus-Monozyt-Makrophagen-Zelllinien PU5-1R und WEHI-3 konnte eine ausreichende Beladung mittels acLDL und eine Synthese und Sekretion von ApoE-ähnlichem Protein nachgewiesen werden. Bei beiden Linien ergaben sich jedoch erhebliche Probleme, wie unregelmäßiges Wachstum in Abhängigkeit verschiedener Lieferchargen des fötalen Kälberserums und eine schwachen Adhärenz der Zellen an die Kulturgefäße. Bei der PU5-1R-Zelllinie konnten diese Probleme durch eine Kultivierung bei 32 °C, welche eine explosionsartige Vermehrung der Zellen bei Beladung mit Cholesterin-reichen Partikeln verhindert, und durch Verwendung von hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum, welches die Adhärenz der Zellen vergrößert, minimiert werden.

Unter diesen Bedingungen konnte eine gute Vergleichbarkeit mit den an Maus-Peritonealmakrophagen gewonnenen Ergebnissen gezeigt werden. Abbildung 4.24 zeigt, daß die beiden ACAT-Inhibitoren Octimibat und Sandoz 58-035 eine Stimulation der Ausschleusung von Cholesterin im Vergleich zur Kontrolle (in Gegenwart von HDL als Akzeptor) bewirken, wobei das eingesetzte ApoE-arme HDL allein nur einen minimalen Effekt zeigt.

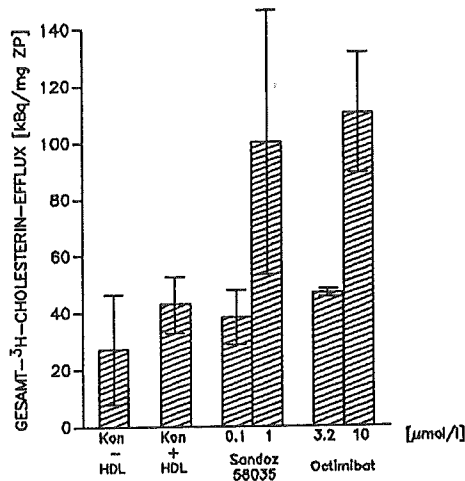


Abb. 4.24: Cholesterin-"Efflux" aus der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie PU5-1R.

Die Zellen wurden in DMEM/ 0,1 % BSA/ 740 kBq <sup>35</sup>S-Methionin für 16 h bei 32 °C (!) im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde ersetzt durch ein Medium, welches zusätzlich 100 µg/ml acetyliertes <sup>3</sup>H-LDL enthielt und die Inkubation für weitere 20 h fortgesetzt. Nach intensivem Waschen der Zellen mit PBS folgte die 16stündige Efflux-Phase mit DMEM, welches 0,025 % BSA, 200 µg/ml ApoE-arme HDL und die angegebenen Substanzen enthielt.

Zur weiteren Aufarbeitung (s. unten) wurden die Efflux-Medien steril entnommen. Die Zellen wurden mittels Gummiwischer abgeschabt, mit PBS-Puffer gewaschen und mittels Ultraschall homogenisiert. Das Zellprotein wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt.

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

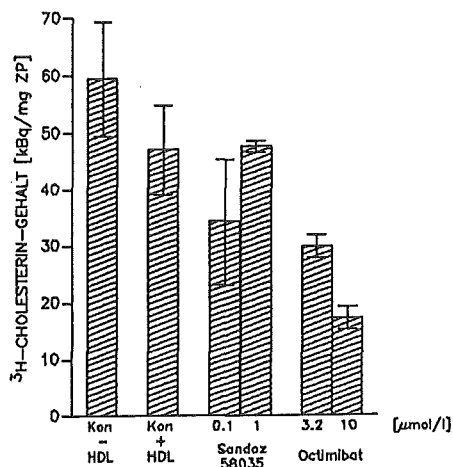


Abb. 4.25: Zellulärer  $^3\text{H}$ -Cholesterin-Gehalt von PU5-1R-Zellen nach experimentellem Cholesterin-"Efflux". Die Experimente wurden durchgeführt, wie in der Legende zu Abb. 4.24 beschrieben. Die Zellradioaktivität wurde in einem Flüssigszintillationszähler (LKB-1219) mit einem implementierten Meßprogramm für Doppelmarkierungen quantifiziert. Konzentrationsangaben sind in  $\mu\text{mol/l}$ . Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. ZP = Zellprotein

Der Gehalt an  $^3\text{H}$ -Cholesterin in der Zelle nimmt dabei entsprechend ab (Abb. 4.25). Differenziert man nun die Cholesterin-Ausschleusung in ein ApoE-abhängigen bzw. -unabhängigen "pathway", in dem man das an Heparin-Sephrose-bindende Material untersucht, so zeigt sich, daß Octimibat eine ausgeprägte Stimulation der Sekretion von ApoE-ähnlichem Protein (Abb. 4.26 + 4.27) und damit assoziiertem Cholesterin (Abb. 4.28 + 4.29) bewirkt, ein Phänomen, welches schon an Maus-Peritonealmakrophagen gezeigt werden konnte. Zusätzlich konnte nach Delipidierung der HDL-Partikel und polyacrylamid-gелеlektrophoretischer Auftrennung der SDS-modifizierten Proteinanteile gezeigt werden, daß nur Octimibat eine Stimulation des  $^{35}\text{S}$ -Methionin-Einbaus in die Proteinbande mit  $M_r = 35.000$  g/mol bewirkt, was als zusätzlicher Hinweis für eine vermehrte ApoE-Synthese interpretiert werden kann (Abb. 4.30).

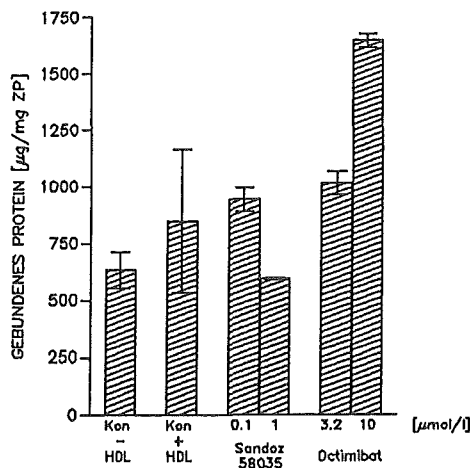


Abb. 4.26: HDL-assoziiertes, an Heparin-Sepharose bindendes Protein.

Die Versuchsdurchführung erfolgte, wie in der Legende zur Abb. 4.24 beschrieben.

Zur Quantifizierung des an Heparin-Sepharose bindenden Materials wurden 2 ml des Efflux-Mediums bei einer Dichte von 1,21 g/ml zur Rückgewinnung der HDL-Fraktion ultrazentrifugiert, dialysiert und mit 100 mg Heparin-Sepharose bei 4 °C in einem 5 mmol/l Natriumacetatpuffer (pH 7,4), welcher 50 mmol/l Natriumchlorid und 25 mmol/l Mangan-(II)-chlorid enthielt, für 16 h inkubiert. Das Sepharosematerial wurde anschliessend mit demselben Puffer gewaschen, und die ApoE-haltigen Lipoproteine wurden zweimal mit je 1 ml eines 5 mmol/l Natriumacetat-Puffers, der 0,095 mol/l Natriumchlorid enthielt, extrahiert. Der Proteingehalt der vereinigten Extrakte wurde nach Bradford (1976) bestimmt.

Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

ZP = Zellprotein

Diese Untersuchungen zeigen, daß frisch isolierte Peritonealmakrophagen in diesem Modell durch die permanente Makrophagen-Zelllinie PU5-1R ersetzt werden können, daneben aber auch wissenschaftlich interessante Unterschiede in den Wirkqualitäten der beiden ACAT-Inhibitoren Sandoz 58-035 und Octimibat bestehen. Prüfsubstanzen, die in diesem Modell positiv bewertet werden, können in dem unter 4.4 vorgestellten Regressionsversuch in vivo untersucht werden.

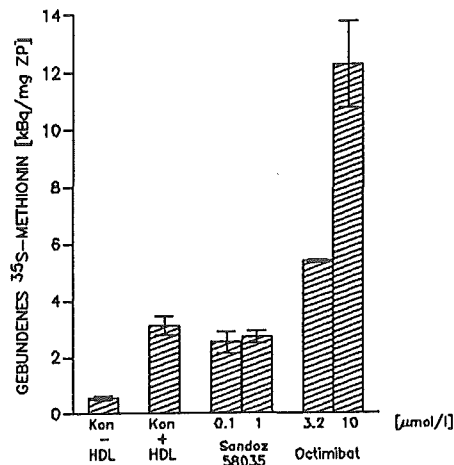


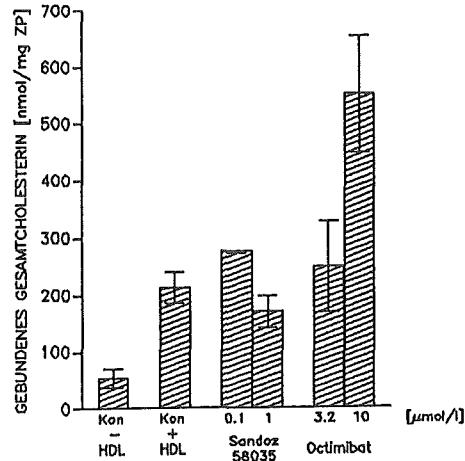
Abb. 4.27: HDL-assoziiertes, an Heparin-Sepharose bindendes <sup>35</sup>S-Methionin.

Inkubationen und Präparation des an Heparin-Sepharose gebundenen Materials wurden, wie in den Legenden zu den Abb. 4.24 und 4.26 beschrieben, durchgeführt.

Die <sup>35</sup>S-Methionin-Radioaktivität wurde in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1219) mit einem implementierten Zählprogramm für Doppelmarkierungen quantifiziert.

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

ZP = Zellprotein



**Abb. 4.28:** HDL-assoziiertes, an Heparin-Sepharose gebundenes Gesamtcholesterin.

Inkubationen und Präparation des an Heparin-Sepharose gebundenen Materials wurden, wie in den Legenden zu den Abb. 4.24 und 4.26 beschrieben, durchgeführt.

Das Gesamtcholesterin wurde nach Extraktion von 500 µl der gebundenen Lipoproteine mit 3 ml Chloroform/ Methanol (2:1; v/v) und Auftrennung der Lipide auf HPTLC-Platten (mobile Phase: n-Hexan/n-Heptan/Diethylether/ Essigsäure = 63/18.5/18.5/1; v/v) bestimmt. Die densitometrische Auswertung erfolgte nach Halpaap (1978), wobei Cholesterinformiat als interner Standard zur Ausbeutekontrolle der Extraktionsschritte eingesetzt wurde.

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

ZP = Zellprotein

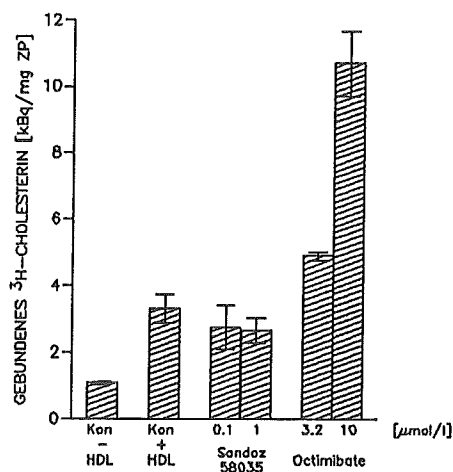


Abb. 4.29: HDL-assoziiertes, an Heparin-Sepharose gebundenes <sup>3</sup>H-Cholesterin.

Inkubationen und Präparation des an Heparin-Sepharose gebundenen Materials wurden, wie in den Legenden zu den Abb. 4.24 und Abb. 4.26 beschrieben, durchgeführt.

Die <sup>3</sup>H-Cholesterin-Radioaktivität wurde in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1219) mit einem implementierten Zählprogramm für Doppelmarkierungen quantifiziert.

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

ZP = Zellprotein

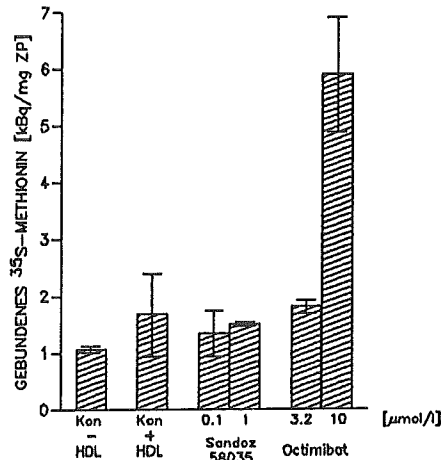


Abb. 4.30: Einfluß der Testsubstanzen auf die Synthese von ApoE-ähnlichen Proteinen. Die Inkubationen wurden durchgeführt, wie in der Legende zu Abb. 4.24 beschrieben. 1 ml des Effluxmediums wurde lyophilisiert, mit Chloroform/Methanol (2:1; v/v) delipidiert und mit  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert. Die so präparierten Proteine wurden auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Zur Kalibrierung und Bestimmung der molaren Masse wurde ein Eichkit (Pharmacia, Nr. 17-0446-01) parallel getrennt. Die Radioaktivität der Proteinbande mit  $M_r = 35,000$  g/mol wurde in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1219) quantifiziert. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. ZP = Zellprotein



## **4.6 Inhibition der Acyl-CoA: Cholesterin-Acyltransferase**

### **4.6.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

In Gegenwart von  $^{14}\text{C}$ -Oleoyle-CoA katalysiert die ACAT den Transfer von  $^{14}\text{C}$ -Oleat auf Cholesterin unter Bildung von Cholesterin- $^{14}\text{C}$ -Oleat, das sich dünnschichtchromatographisch von dem nicht umgesetzten  $^{14}\text{C}$ -Oleoyle-CoA trennen und durch Radioaktivitätsmessung quantifizieren läßt. In Gegenwart von ACAT-Inhibitoren ist die Bildungsgeschwindigkeit des radioaktiv markierten Cholesterinesters herabgesetzt. Als Enzymquelle lassen sich Zellhomogenate (Fibroblasten, Makrophagen, Hepatozyten) oder mikrosomale Membranen aus Rattenleber verwenden. Letztere enthalten genügend endogenes Cholesterin, so daß ein Zusatz von Cholesterin zum Reaktionsansatz überflüssig ist.

In diesem Test sollten diejenigen Substanzen untersucht werden, die im Makrophagenversuch (Kap. 4.4) einen positiven Effekt zeigten. Der Test erlaubt eine Aussage darüber, ob die an Makrophagen festgestellte Reduktion des Cholesterinester-Gehaltes auf eine direkte inhibitorische Wirkung der Substanz auf die ACAT zurückzuführen ist oder ob die Substanz einen anderen Angriffspunkt, z.B. Aktivierung der Cholesterinesterase, besitzt.

Hemmer der Cholesterin-Veresterung könnten durch Verschiebung des Cholesterin/Cholesterinester-Quotienten den Abtransport des zellulär gespeicherten Cholesterins ("reverse cholesterol transport") in die Leber mit Hilfe der HDL erleichtern und somit antiatherosklerotisch wirksam sein.

### **4.6.2 Material und Methoden**

#### **4.6.2.1 Material**

##### **4.6.2.1.1 Versuchstiere**

Für die Präparation mikrosomaler Membranen werden die Lebern von männlichen Wistar-Ratten (Züchter: Fa. Hagemann, Extertal) verwendet. Die Tiere werden in Makrolonkäfigen unter standardisierten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur

22 ± 2 °C), Hell-Dunkel-Rhythmus 12 h). Die Tiere erhalten Standardfutter (Altromin, Lage) bzw. Cholesterin-reiches Futter (1,5 %, 0,5 % Natriumcholat) und Trinkwasser ad libitum. Vor Entnahme der Lebern wiegen die Tiere ca. 200 g.

#### 4.6.2.1.2 Puffer

a) Homogenisationspuffer

0,15 mol/l  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$   
50,00 mmol/l NaF, pH 7,4

b) Testpuffer

0,1 mol/l  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH 7,4

c) Prüfsubstanzen

Im Standardtest wird eine Prüfsubstanz bei 10 bzw. 31,6 µmol/l und bei definierter Cholesterin-Konzentration (ca. 3 µg/100 µg Membranprotein) untersucht. Wasserunlösliche Prüfsubstanzen können in DMSO, DMF oder Dioxan gelöst werden (Endkonzentration im Testansatz 1 %).

#### 4.6.2.1.3 Reagenzien

a) Oleoyl-CoA-Lösung:

Die Oleoyl-CoA-Stammlösung (100 µmol/l im Test-Puffer) wird in 1 ml-Aliquots bei -20 °C eingefroren.

Zu 1 ml dieser Stammlösung werden 50 µl  $^{14}C$ -Oleoyl-CoA (NEN, spez. Akt. 0,2 GBq/mmol) zugegeben. Von dieser Substratlösung werden 40 µl/200 µl Testansatz eingesetzt (spez. Akt. ca. 0,37 kBq/nmol).

b) Cholesterin-Lösung:

2 mg Cholesterin in 1 ml Chloroform lösen

- 400 µl in ein kalibriertes Reagenzglas mit abgerundeter Spitze pipettieren
- $CHCl_3$  mit  $N_2$  abblasen
- mit 300 µl Triton WR 1339 (Tyloxapol, Fa. Sigma), 2 % in Aceton (w/v), lösen
- 2 ml Test-Puffer (50-60 °C) vorsichtig mit Spritze zugeben
- Aceton mit  $N_2$  abblasen

50 µl dieser Lösung enthalten 20 µg Cholesterin und 300 µg Triton WR 1339.

#### **4.6.2.2 Methoden**

##### **4.6.2.2.1 Präparation mikrosomaler Membranen**

###### **a) Homogenisierung**

Die Lebern von Ratten (Wistar, männlich) werden sofort nach der Dekapitation entnommen, in eiskaltem Homogenisationspuffer gewaschen, zerkleinert und im Eisbad mit einem elektrischen Potter-Homogenisator (Braun, Melsungen) bei 1.100 U/min homogenisiert (10 %iges Leberhomogenat).

###### **b) Zentrifugationen**

Alle Zentrifugationen werden bei 4 °C durchgeführt.

Das Leberhomogenat wird zur Beseitigung von Zellbruchstücken 10 min bei 800 x g zentrifugiert, der Überstand filtriert und anschließend 30 min bei 12.000 x g zentrifugiert.

Der 12.000 x g-Überstand wird dann in einer Ultrazentrifuge 60 min bei 100.000 x g zentrifugiert. Das Pellet (mikrosomale Membranen) wird im Homogenisationspuffer resuspendiert und erneut 60 min bei 100.000 x g zentrifugiert. Das mikrosomale Pellet wird nach Resuspension und Einstellen einer definierten Proteinkonzentration (100-150 µg/60 µl) im Test-Puffer aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

##### **4.6.2.2.2 Präparation von Cholesterin-haltigen Liposomen**

L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (Typ III, Fa. Sigma) und Cholesterin werden als Stammlösung in Chloroform jeweils in einer Konzentration von 1 µmol/ml hergestellt. Entsprechend ihrem für den Test benötigten molaren Verhältnis werden die Lipide gemischt und das Chloroform mit Stickstoff abgeblasen. Danach wird soviel Testpuffer zugegeben, bis die jeweilige Lipid-Konzentration der Stammlösung erreicht ist. Diese Suspension wird 10 min im Eisbad bei 50 W beschallt (Branson Sonifier B-12, Microtip).

##### **4.6.2.2.3 Bestimmung der ACAT-Aktivität**

Die ACAT-Aktivität in mikrosomalen Membranen wird durch Berechnung der Einbaurate von [1-<sup>14</sup>C] Oleoyl-CoA in Chole-

sterinoleat bestimmt. Das Standardinkubationsmedium mit einem Gesamtvolumen von 200 µl enthält Phosphatpuffer (100 mmol/l, pH 7,4) und mikrosomale Membranen (100 µg Protein, 3-4 µg Cholesterin).

Exogenes Cholesterin wird in verschiedenen Konzentrationen durch Suspendieren in Triton WR 1339 in einem Verhältnis von Triton zu Cholesterin von 20:1 (w/w) dem Reaktionsansatz zugegeben bzw. in Liposomenform.

Die Prüfsubstanzen werden in den entsprechenden Lösungsmitteln gelöst und zusammen mit dem Phosphatpuffer zugegeben. Die mikrosomalen Membranen werden im Inkubationsmedium in Anwesenheit der Prüfsubstanzen 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Im Falle der Zugabe von exogenem Cholesterin wird zunächst 20 min (Cholesterin/Triton WR 1339 und Liposomen) und nach Zugabe der Prüfsubstanz weitere 10 min bei 37 °C vorinkubiert.

Die Reaktion wird durch Zugabe von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Oleoyl-CoA (Endkonzentration 20 µmol/l; spez. Akt. 0,37 kBq/nmol) gestartet.

Nach 15 min wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Ethanol mit internem Standard ( $^3\text{H}$ -Cholesterinoleat, 0,84 kBq) gestoppt. Die Proben werden zweimal mit 3 ml n-Hexan extrahiert und die Phasentrennung durch Zentrifugation für 5 min bei 2.000 U/min) beschleunigt. Die Hexanphase wird entnommen und unter einem Stickstoffgasstrom bei 25-30 °C bis zur Trockne abgeblasen. Nach Resuspension in 50 µl n-Hexan wird die Cholesterinester durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (Kieselgel LK5D Linear-K, Fa. Whatman) in n-Hexan, Diethylether, Eisessig (85:15:1 v/v/v) als Laufmittel isoliert.

Die Cholesterinester-Zonen werden mittels einer Beta-Kamera (LB 292, Fa. Berthold) lokalisiert und direkt in Szintillationsgefäße ausgeschabt.

Nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit (Instagel II, Fa. Packard) werden die Radioaktivitäten in einem Flüssigszintillationszähler (Rackbeta 1219, LKB-Wallac) gemessen. Die Proteinbestimmung erfolgt nach der Methode von Lowry et al., 1951.

#### 4.6.3 Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 4.31 zeigt die dünnschichtchromatographische Abtrennung des Cholesterin- $^{14}\text{C}$ -Oleats von  $^{14}\text{C}$ -Oleoyle-CoA,  $^{14}\text{C}$ -markierten Triglyceriden und  $^{14}\text{C}$ -markierten Phospholipiden.

Als Enzymquellen werden routinemäßig mikrosomale Membranen aus Rattenleber verwendet. Alle Reaktionsansätze werden standardmäßig in Anwesenheit von 0,1 % PPC (Polyenyl-Phosphatidylcholin) inkubiert, wodurch eine Stabilisierung des Testsystems und eine optimale Suspendierung wasserunlöslicher Substanzen (nach Vorlösen in einem organischen Lösungsmittel) gewährleistet wird. Die ACAT-Aktivität wird durch den Zusatz von 0,1 % PPC nicht beeinflusst.

Erste Untersuchungen dienten der Optimierung der Inkubationsbedingungen: Abbildung 4.32 zeigt die Abhängigkeit der Bildung von  $^{14}\text{C}$ -Cholesterin-Oleat von der Konzentration der mikrosomalen Proteine (Abb. 4.32A) bzw. der Inkubationszeit (Abb. 4.32B). Unter den gewählten Inkubationsbedingungen verläuft die Bildung von Cholesterin-Oleat bis zu einer Proteinkonzentration von 200  $\mu\text{g}$  linear und erreicht ihr Maximum nach einer Inkubationszeit von 30 min, während bei längerer Inkubationsdauer die Konzentration des gebildeten Cholesterin-Oleats geringfügig abzunehmen scheint. Aus der Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Konzentration an Oleoyle-CoA läßt sich nach Lineweaver-Burk eine Michaelis-Konstante von 77  $\mu\text{mol/l}$  für Oleoyle-CoA ermitteln (Abb. 4.33).

Rinderserumalbumin (BSA) stabilisiert Membransysteme, bindet lipophile Strukturen wie freie Fettsäuren, Acylreste, Hormone und verschiedene Pharmaka, hält diese dadurch in Lösung und ermöglicht einen besseren Transport dieser Substanzen zu membrangebundenen Enzymen. Daher wurde der Einfluß von BSA auf die Aktivität der ACAT in diesem Testsystem untersucht. Wie Abbildung 4.34 zeigt, erhöht BSA bei gleichbleibender Konzentration von Oleoyle-CoA die Aktivität der ACAT bis zu einem molaren Verhältnis von BSA/Oleoyle-CoA von 1:1 bis 2:1 (Abb. 4.34B).

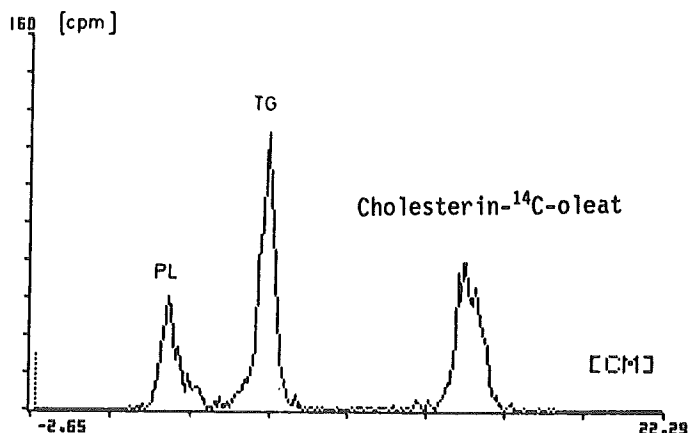


Abb. 4.31: Trennung von Cholesterin- $^{14}\text{C}$ -Oleat,  $^{14}\text{C}$ -Oleoyl-CoA,  $^{14}\text{C}$ -markierten Triglyceriden und  $^{14}\text{C}$ -markierten Phospholipiden mittels Dünnschichtchromatographie auf LK5D Kieselgelplatten (Whatman). Mobile Phase: *n*-Hexan/Diethylether/Essigsäure = 85:15:1 (v/v). Für den Assay wurden 40  $\mu\text{g}$  mikrosomale Proteine in 0,15 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, welcher 10 mmol/l Dithiothreitol und 80  $\mu\text{mol/l}$  BSA enthielt, in einem Endvolumen von 0,2 ml eingesetzt. Diese Mischung wurde 5 min bei 37 °C inkubiert und die Veresterungsreaktion durch Zusatz von 20 nmol/l  $^{14}\text{C}$ -Oleoyl-Coenzym A gestartet. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 1 ml Ethanol, welcher  $^3\text{H}$ -Cholesterinoleat (ca. 20.000 dpm) als internen Standard enthielt, nach 10 min gestoppt. Nach Extraktion mit 3 ml *n*-Hexan und Zentrifugation wurde die organische Phase unter Stickstoffgasstrom getrocknet und mit dem oben angegebenen Trennsystem separiert. Die Trennstrecken wurden gescannt, die Lipidflecken in der Jodkammer visualisiert, die radioaktiven Bereiche ausgekratzt und in einem Flüssigszintillationszähler mit einem implementierten Meßprogramm für Doppelmarkierungen quantifiziert.  
(PL = Phospholipide; TG = Triglyceride).

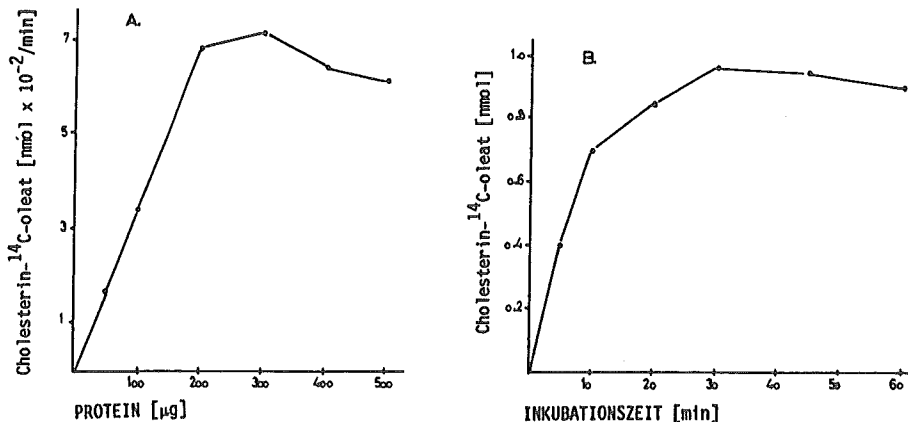
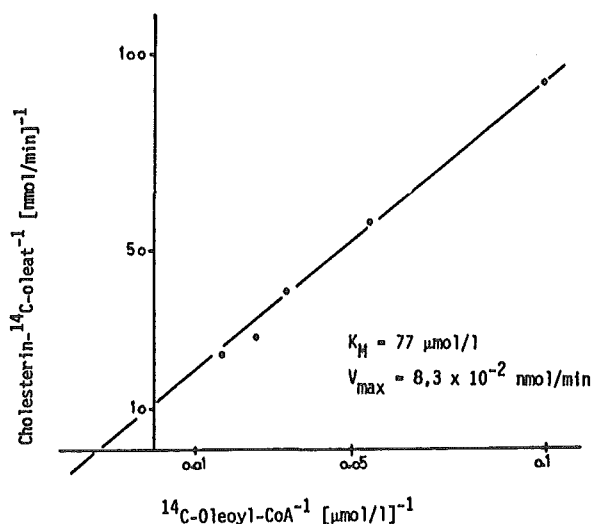


Abb. 4.32: Der Einfluß der Proteinkonzentration (A) bzw. der Inkubationszeit (B) auf die Bildung von  $^{14}\text{C}$ -Cholesterinoleat aus  $^{14}\text{C}$ -Oleoyle-CoA. 100–500  $\mu\text{g}$  (A) bzw. 100  $\mu\text{g}$  (B) mikrosomale Proteine wurden in 50  $\mu\text{l}$  0,1 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, welcher 0,1 % PPC enthielt, für 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zusatz einer  $^{14}\text{C}$ -Oleoyle-CoA/BSA-Lösung in 0,1 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, welcher ebenfalls 0,1 % PPC enthielt, gestartet. Die Endkonzentration betrug 100  $\mu\text{mol/l}$  bzw. 0,1  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Oleoyle-CoA bei 200  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen. Die Inkubationen wurden bei 37 °C für 20 Min. (A) bzw. für die angegebenen Zeiten (B) durchgeführt. Gestoppt wurden die Reaktionen durch Eiskühlung der Proben und Zugabe von 1 ml Ethanol, welcher  $^3\text{H}$ -Cholesterinoleat (0,05  $\mu\text{Ci}$ ) als internen Standard enthielt. Nach Extraktion mit 3 ml n-Hexan und Zentrifugation wurde die organische Phase unter Stickstoffgasstrom getrocknet, der Extrakt auf Whatman-Kieselgelplatten LK5D aufgetragen und in n-Hexan/Diethylether/Essigsäure = 85:15:1 (v/v) entwickelt. Die Detektion der radioaktiven Zonen erfolgte durch Radiophotographie ( $\beta$ -Kamera, Fa. Berthold). Nach Markierung wurden die radioaktiven Bereiche ausgekratzt und in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1219) mit einem implementierten Meßprogramm für Doppelmarkierungen quantifiziert.



**Abb. 4.33:** Abhängigkeit der ACAT-Aktivität von der Substratkonzentration in doppelt reziproker Auftragung. Die Inkubationen wurden bei 37 °C für 20 min in Gegenwart von 100  $\mu\text{g}$  mikrosomaler Proteine unter Standardbedingungen, wie in der Legende zu Abb. 4.32 beschrieben, durchgeführt. Die Oleoyl-CoA-Konzentration wurde variiert.

Da jedoch neben Oleoyl-CoA bei dem Assay auch Testsubstanzen an BSA gebunden werden können, galt es zu prüfen, welchen Einfluß die Anwesenheit von BSA im Reaktionsansatz auf die inhibitorische Potenz von lipophilen Substanzen ausübt. Für diese Untersuchung wurden zunächst repräsentativ Octimibat und Progesteron ausgewählt. Tab. 4.10 zeigt, daß mit steigenden BSA-Konzentration die ACAT-Hemmung sowohl durch Octimibat als auch durch Progesteron deutlich abnimmt.



Tab. 4.10: Der Einfluß von BSA im Reaktionsansatz auf die ACAT-Inhibition durch Octimibat and Progesteron. 100 µg mikrosomale Proteine wurden in 50 µl 0,1 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, welcher 0,1 % PPC, 100 µmol/l Octimibat bzw. 100 µmol/l Progesteron und die angegebenen Konzentrationen BSA enthielt, 10 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz einer  $^{14}\text{C}$ -Oleoyl-CoA/BSA-Lösung in 0,1 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, welcher ebenfalls 0,1 % PPC enthielt, gestartet; die Endkonzentration betrug 30 µmol/l bzw. 0,1 µCi  $^{14}\text{C}$ -Oleoyl-CoA bei 200 µl Reaktionsvolumen. Gestoppt wurde die Reaktion nach 15 min durch Eiskühlung der Proben und Zugabe von 1 ml Ethanol, welches  $^3\text{H}$ -Cholesterinoleat (0,05 µCi) als internen Standard enthielt. Nach Extraktion mit 3 ml n-Hexan und Zentrifugation wurde die organische Phase unter Stickstoffgasstrom getrocknet, der Extrakt auf Whatman-Kieselgelplatten LK5D aufgetragen und in n-Hexan/ Diethylether/ Essigsäure = 85:15:1 (v/v) entwickelt. Die Detektion der radioaktiven Zonen erfolgte durch Radiophotographie ( $\beta$ -Kamera, Fa. Berthold); nach Markierung wurden die radioaktiven Bereiche ausgekratzt und in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1219) mit einem implementierten Meßprogramm für Doppelmarkierungen quantifiziert.

Substanz	BSA [µmol/l]	Inhibition [%]
Octimibat	-	66
	50	48
	100	29
Progesteron	-	46
	50	41
	100	22

Bei beiden Verbindungen ist bei einer Konzentration von 100 µmol/l BSA die inhibitorische Potenz auf weniger als 50 % der Kontrolle ohne BSA reduziert. Da jedoch bei der eben genannten BSA-Konzentration die Geschwindigkeit der Cholesterin-Veresterung maximal und die Aktivität der ACAT etwas mehr als verdoppelt ist, könnte die erwähnte gesteigerte Verfügbarkeit von Oleoyl-CoA zur Verdrängung des Inhibitors vom aktiven Zentrum des Enzyms führen und so eine verminderte inhibitorische Potenz vortäuschen. Diese Erklärung bietet sich besonders bei kompetitiven Inhibitoren

vom Typ des Octimibats an. Daneben ist jedoch nicht auszuschließen, daß in Gegenwart von BSA die aktuelle Konzentration des Inhibitors am Enzymmolekül reduziert ist. Um solche möglicherweise von der Struktur der Prüfsubstanz abhängigen Effekte auszuschließen, wurde beim Screening von Substanzen auf BSA im Inkubationsansatz verzichtet.

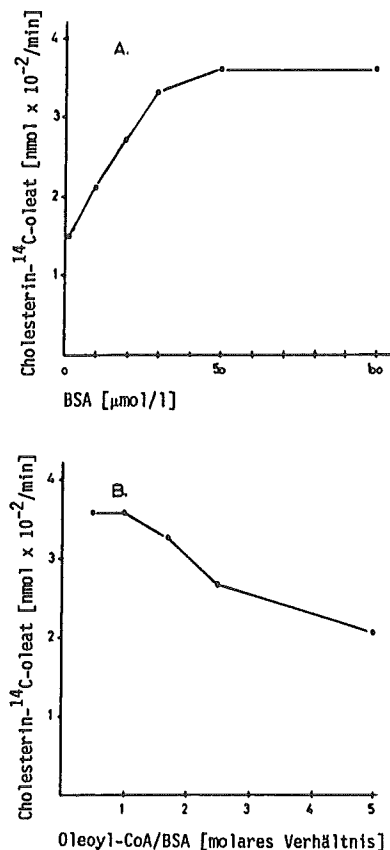


Abb. 4.34: Abhängigkeit der ACAT-Aktivität von der BSA-Konzentration im Reaktionsansatz. Die Inkubationen wurden bei 37 °C für 20 min (100 μg mikrosomale Proteine) in Gegenwart von 50 μmol/l Oleoyl-CoA unter Standardbedingungen, wie in der Legende zu Abb. 4.33 beschrieben, durchgeführt; die BSA-Konzentration wurde variiert.

Um auch nicht-wasserlösliche Substanzen in diesem Test prüfen zu können, wurde der Einfluß verschiedener organischer Lösungsmittel auf die Aktivität der ACAT untersucht. Tabel-

le 4.11 zeigt, daß sich nur Aceton und besonders DMSO bis zu 2 % Endkonzentration als Lösungsvermittler eignen, während alle verwendeten Alkohole die Bildung von Cholesterin-Oleat deutlich reduzierten.

*Tab. 4.11: Der Einfluß von Lösungsmitteln auf die ACAT-Aktivität.*

*Die Inkubationen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt (37 °C, 20 min). Die Lösungsmittel wurden während der Vorinkubationsphase der mikrosomalen Suspension (100 µg Protein) zugesetzt; die Endkonzentration im 200-µl-Reaktionsansatz betrug 2 %. Kontrollexperimente wurden ohne Zusatz von organischen Lösungsmitteln durchgeführt und die so erhaltene ACAT-Aktivität als 100 % definiert.*

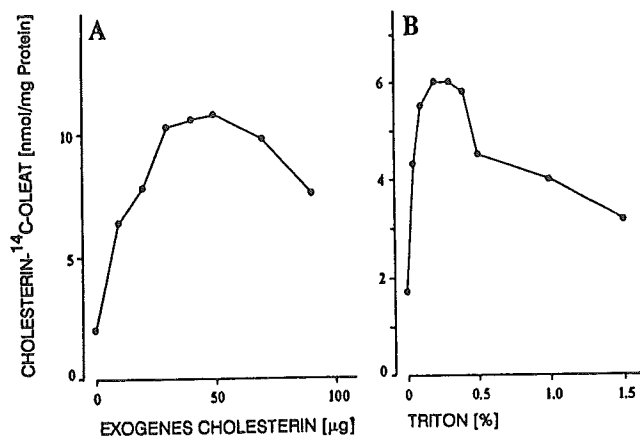
Lösungsmittel (2 %)	% Enzymaktivität
Kontrolle (Wasser)	100
Methanol	57
Ethanol	41
Isopropanol	45
DMSO	97
Aceton	78

Darüberhinaus wurde bei Inkubation in Gegenwart der Alkohole nach dünnschichtchromatographischer Trennung der Reaktionsprodukte eine zusätzliche radioaktiv markierte Bande mit einem etwas geringeren  $R_F$ -Wert beobachtet. Diese Bande dürfte aufgrund des  $R_F$ -Wertes dem jeweiligen Alkyl-Oleat zuzuordnen sein, das aus Alkohol und Oleoyl-CoA unter den Inkubationsbedingungen gebildet wird. Die verminderte Bildung von Cholesterin-Oleat in Gegenwart der Alkohole dürfte in dieser Konkurrenzreaktion begründet sein.

Weitere Untersuchungen hatten das Ziel, den Einfluß unterschiedlicher Substrat- und Detergenz-Konzentrationen auf die Aktivität der ACAT und die Hemmwirkung von Prüfsubstanzen zu erforschen:

Bei einer zunächst willkürlich gewählten Triton-Konzentration von 0,25 % und 125 µg Protein im Inkubationsansatz führt der Zusatz von exogenem Cholesterin zu einer Aktivierung des Enzyms, die bei etwa 20 µg Cholesterin ihr Maximum erreicht

(Abb. 4.35A). Inkubiert man bei konstanter Cholesterin-Menge (50 µg/Ansatz) und variiert die zugesetzte Menge Triton, so findet man ein Maximum an Enzymaktivität zwischen 0,2 und 0,3 % Triton im Reaktionsansatz (Abb. 4.35B). Ergebnis der beiden geschilderten Untersuchungen ist also, daß unter den gewählten Bedingungen bei einem Reaktionsvolumen von 200 µl maximale ACAT-Aktivität bei einem Zusatz von 50 µg exogenem Cholesterin und 0,25 % Triton gemessen werden kann.



**Abb. 4.35:** Der Einfluß von exogenem Cholesterin und Triton WR 1339 auf die ACAT-Aktivität in mikrosomalen Membranen von Rattenleber.

Mikrosomale Proteine (100–500 µg) wurden in 160 µl 0,1 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, welcher 0,1 % Polyenyl-Phosphatidylcholin (PPC) und die Testsubstanzen ( $c = 31,6 \mu\text{mol/l}$ ) enthielt, 10 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 3,7 kBq <sup>14</sup>C-Oleoyl-CoA in 0,1 % PPC (in obigen Phosphatpuffer) gestartet; die Endkonzentration von Oleoyl-CoA betrug 20 µmol/l bei einem Inkubationsvolumen von 200 µl. Gestoppt wurden die Reaktionen nach 20 Min. durch Eiskühlung der Proben und Zugabe von 1 ml Ethanol, welches <sup>3</sup>H-Cholesterinoleat (0,05 µCi) als internen Standard enthielt. Nach Extraktion mit 3 ml n-Hexan und Zentrifugation, wurde die organische Phase unter Stickstoffgasstrom getrocknet, der Extrakt auf Whatman-Kieselgelplatten LK5D aufgetragen und in n-Hexan/ Diethylether/Essigsäure = 85:15:1 (v/v) entwickelt. Die Detektion der radioaktiven Zonen erfolgte durch Radiophotographie (β-Kamera, Fa. Berthold); nach Markierung wurden die radioaktiven Proben ausgekratzt und in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1219) mit einem implementierten Meßprogramm für Doppelmarkierungen quantifiziert.

(A) Die mikrosomalen Membranen wurden in Gegenwart von exogenem Cholesterin in den angegebenen Konzentrationen für 10 min inkubiert; die Triton WR 1339-Konzentration wurde mit 0,25 % konstant gehalten.

(B) Die mikrosomalen Membranen wurden in Gegenwart von 50 µg/200 µl exogenem Cholesterin für 10 min inkubiert; die Triton WR 1339-Konzentration wurde wie angegeben variiert.

Abbildung 4.36 zeigt den Einfluß der Vorinkubationszeit, d.h. der Zeit bis zur Zugabe des radioaktiv markierten Donorsubstrates  $^{14}\text{C}$ -Oleoyl-CoA, auf die Aktivität der ACAT. Während in Abwesenheit von exogenem zugeführtem Cholesterin keine signifikante Änderung der Enzymaktivität festzustellen war, erreichte die ACAT unter den bisher ermittelten optimalen Bedingungen (50  $\mu\text{g}$  Cholesterin, 0,25 % Triton) eine maximale Aktivität nach einer 20minütigen Vorinkubationszeit.

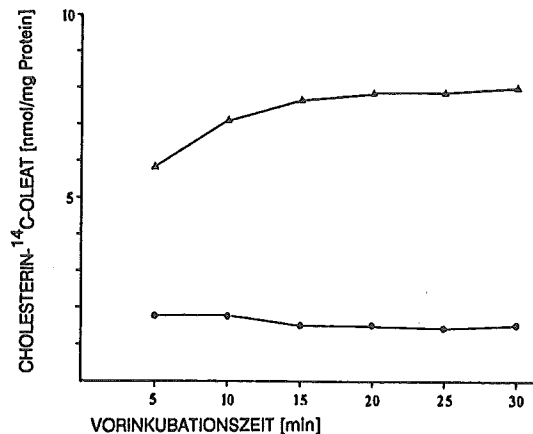


Abb. 4.36: Abhängigkeit der ACAT-Aktivität von der Vorinkubationszeit der mikrosomalen Membranen in Gegenwart exogenen Cholesterins.

Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zu Abb. 4.35 beschrieben, mit 50  $\mu\text{g}$  exogenem Cholesterin in 0,25 % Triton WR 1339 durchgeführt, das vor der Vorinkubation zugesetzt wurde.

- ohne exogenes Cholesterin = Kontrolle
- ▲ + 50  $\mu\text{g}$  exogenes Cholesterin

Untersucht man die Abhängigkeit der Bildung von Cholesterin- $^{14}\text{C}$ -Oleat von der Menge enzymatisch aktiven Proteins im Reaktionsansatz, so findet man unter den bisher ermittelten optimalen Bedingungen (50  $\mu\text{g}$  Cholesterin, 0,25 % Triton) maximale Esterbildung bei 100  $\mu\text{g}$  mikrosomaler Proteine (Abb. 4.37), was in guter Übereinstimmung mit den in Abb. 4.35 niedergelegten Ergebnissen steht. Bewertet man allerdings nicht die absolute Menge des gebildeten Cholesterin-Oleats, sondern die spezifische Aktivität der ACAT, so stellt man fest, daß diese

mit zunehmender Proteinmenge abnimmt (Abb. 4.37B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die ACAT-Aktivität nicht von der Absolutmenge Cholesterin im Reaktionsansatz abhängig ist, sondern von der Relation Enzymprotein/Cholesterin. Diese Vermutung basiert allerdings auf der Annahme, daß die Konzentration des Donorsubstrates Oleoyl-CoA nicht limitiert ist.

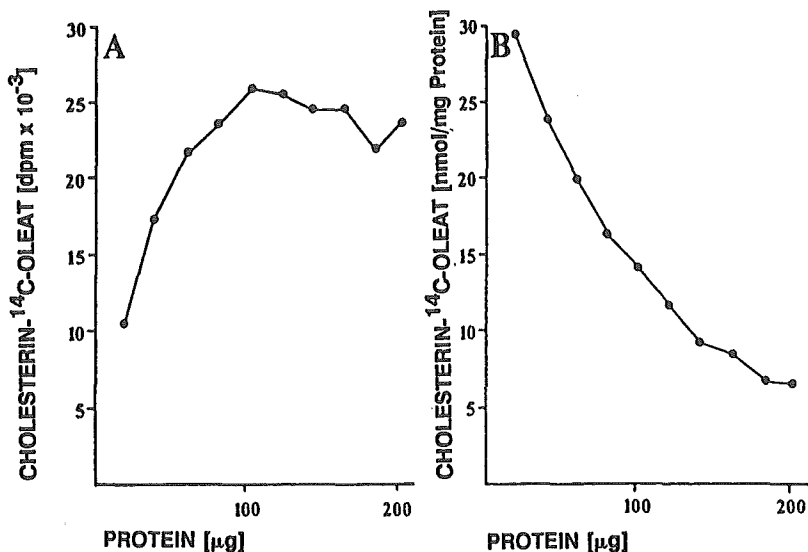


Abb. 4.37: Der Einfluß der Menge mikrosomaler Proteine im Reaktionsansatz auf die ACAT-Aktivität in Gegenwart von exogenem Cholesterin. Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zu Abb. 4.35 beschrieben, in Gegenwart von 50 µg exogenem Cholesterin in 0,25 % Triton WR 1339 (Zusatz vor der Vorinkubationsphase) und den angegebenen Mengen mikrosomaler Proteine durchgeführt.  
 (A) absolute Aktivität (Bildung von Cholesterin-<sup>14</sup>C-Oleat in dpm)  
 (B) spezifische Aktivität (Bildung von Cholesterin-<sup>14</sup>C-Oleat pro mg Protein)

Zur Stützung dieser Vermutung wurde die Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Bildung von Cholesterin-Oleat von der Menge mikrosomalen Proteins bei konstanter Protein/Cholesterin-Relation gemessen (Abb. 4.38). Die Tatsache, daß im Gegensatz zu den bei konstanter Cholesterin-Konzentration erzielten Ergebnissen (Abb. 4.37A) die Geschwindigkeit der Bildung von Cholesterin-Oleat mit der Menge zugesetzten

Enzymproteins bei konstantem Protein/Cholesterin-Verhältnis korreliert, bestätigt die Richtigkeit der eben genannten Vermutung.

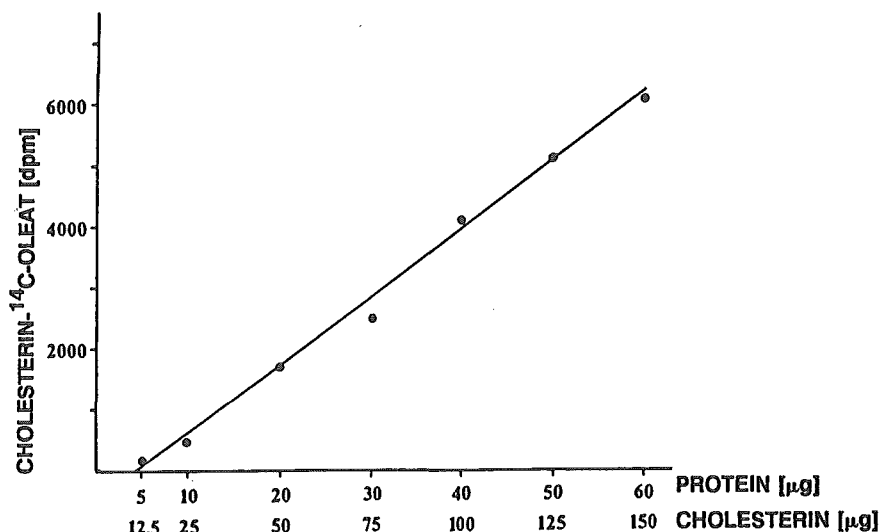


Abb. 4.38: Die ACAT-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen mikrosomaler Proteine bzw. Cholesterin bei konstantem Protein/Cholesterin-Verhältnis. Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zu Abb. 4.35 beschrieben, durchgeführt. Das exogene Cholesterin wurde, wie angegeben, so zugesetzt, daß sich ein Cholesterin/Proteinverhältnis von 2,5:1 ergab. Die Triton-WR-1339-Konzentration wurde mit 0,25 % konstant gehalten.

Voruntersuchungen des Einflusses unterschiedlicher Cholesterin-Konzentrationen bei konstantem Cholesterin/Triton-Verhältnis von 1:10 (w/w) - Ergebnis der in Abb. 4.39 graphisch dargestellten Untersuchungen - auf die inhibitorische Potenz des ACAT-Inhibitors Octimibat zeigten, daß die Inhibition von Octimibat mit zunehmender Cholesterin-Menge im Reaktionsansatz abnimmt und bei einem Zusatz von 10 µg Cholesterin nur noch 50 % der ohne Zusatz von Cholesterin erzielten Hemmwirkung beträgt.

Aus diesem Grunde wurde der Einfluß der Akzeptorsubstrat-Konzentration auf die ACAT-Aktivität in Abwesenheit und in Anwesenheit von 10 bzw. 31,6 µmol/l Octimibat in einem Bereich von 0-10 µg exogen zugesetztem Cholesterins näher untersucht.



Das endogen bereits vorhandene Cholesterin wurde mit 2 µg/ 125 µg mikrosomalen Protein bestimmt und für die gewählte Cholesterin/Triton Relation von 1:10 mitberücksichtigt. Abbildung 4.39 zeigt, daß mit zunehmender Cholesterin-Menge im Reaktionsansatz die spezifische ACAT-Aktivität zunimmt, wobei die maximale Aktivität mit 11 nmol Cholesterinoleat/ mg Protein bereits bei einer Cholesterin-Menge von 10 µg/ Ansatz erreicht wurde. Etwa die gleiche maximale Aktivität wurde bei einer Triton-Konzentration von 0,25 % und einem Zusatz von 50 µg Cholesterin in einem der vorher beschriebenen Experimente gemessen (Abb. 4.35). Diese Ergebnisse stehen nicht im Widerspruch zueinander, sie bestätigen im Gegenteil das Ergebnis der Untersuchungen, daß nicht allein die absolute Cholesterin-Menge im Reaktionsansatz, sondern das Verhältnis von Cholesterin und Detergenz die enzymatische Aktivität bestimmt.

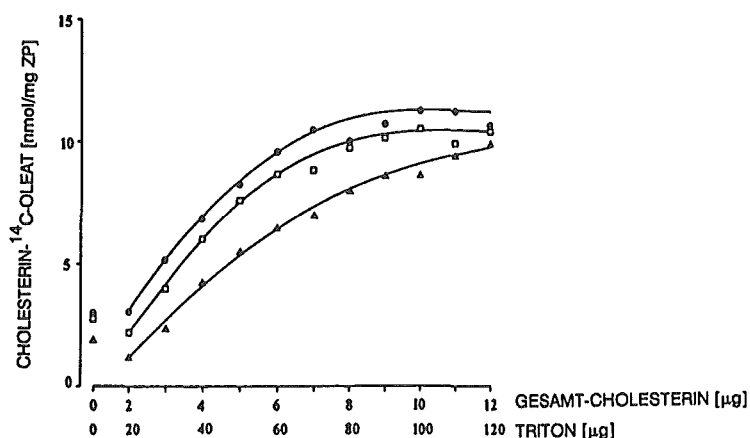


Abb. 4.39: Einfluß des Zusatzes von exogenem Cholesterin auf den inhibitorischen Effekt von Octimibat auf die ACAT-Aktivität.

Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zu Abb. 4.35 beschrieben, durchgeführt. Es wurde exogenes Cholesterin in Triton WR 1339 zugesetzt und 20 min vorinkubiert. Das Gesamtcholesterin (endogenes + exogenes Cholesterin)/Triton-Verhältnis wurde konstant 1:10 (w/w) gehalten.

- Kontrolle
- 10,0 µmol/l Octimibat
- ▲ 31,6 µmol/l Octimibat

In Gegenwart des ACAT-Inhibitors Octimibat wird die ACAT konzentrationsabhängig inhibiert. Auffällig ist, daß in einem großen Bereich die Hemmung der ACAT durch Octimibat in Gegenwart zunehmender Mengen Cholesterins vom Absolutwert her nahezu konstant bleibt, während die prozentuale Hemmung kontinuierlich abnimmt. Dieser Befund ist in gute Übereinstimmung zu bringen mit der Interpretation, daß Octimibat nicht nur an die Bindungsstelle für Oleoyl-CoA bindet, sondern auch an die Bindungsstelle für Cholesterin, so daß mit zunehmender Cholesterin-Konzentration weniger Inhibitor an das Enzym gebunden wird und damit seine Wirkung entfalten kann.

Diese Annahme konnte durch enzymkinetische Untersuchungen und Auswertung nach Lineweaver-Burk bestätigt werden. In Gegenwart von Octimibat beeinflusste exogen zugesetztes Cholesterin nicht die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion, jedoch die scheinbare Michaelis-Konstante (Abb. 4.40).

Die Kompetition von Octimibat mit Cholesterin um die Cholesterin-Bindungsstelle am Enzymprotein drückt sich also in einer scheinbaren Abnahme der Affinität des Enzyms zum Substrat Cholesterin aus, so daß in Anwesenheit von Octimibat mehr Cholesterin benötigt wird, um wieder die Maximalgeschwindigkeit des Umsatzes zu erreichen. Eine Beeinflussung der Enzymkinetik durch das Donor-Substrat Oleoyl-CoA unter den gewählten experimentellen Bedingungen kann ausgeschlossen werden, da eine ausreichend hohe Menge Oleoyl-CoA im Reaktionsansatz vorhanden und damit das Enzym mit diesem Substrat gesättigt war.

Für Octimibat und seinen in der Fettsäurekette um 2 C-Atome verkürzten Metaboliten NAT 06-209 wurden unter verschiedenen experimentellen Bedingungen die Inhibitions-Konstanten ( $K_i$ ) bestimmt (Tab. 4.12). Beide Substanzen sind sowohl gegenüber Cholesterin als auch Oleoyl-CoA kompetitive Inhibitoren. Die relativ hohen Inhibitor-Konstanten gegenüber Oleoyl-CoA in Gegenwart sättigender Cholesterin-Konzentrationen machen deutlich, daß unter diesen Bedingungen der Einfluß der Substanzen auf die Oleoyl-CoA-Bindungsstelle von untergeordneter Bedeutung ist.

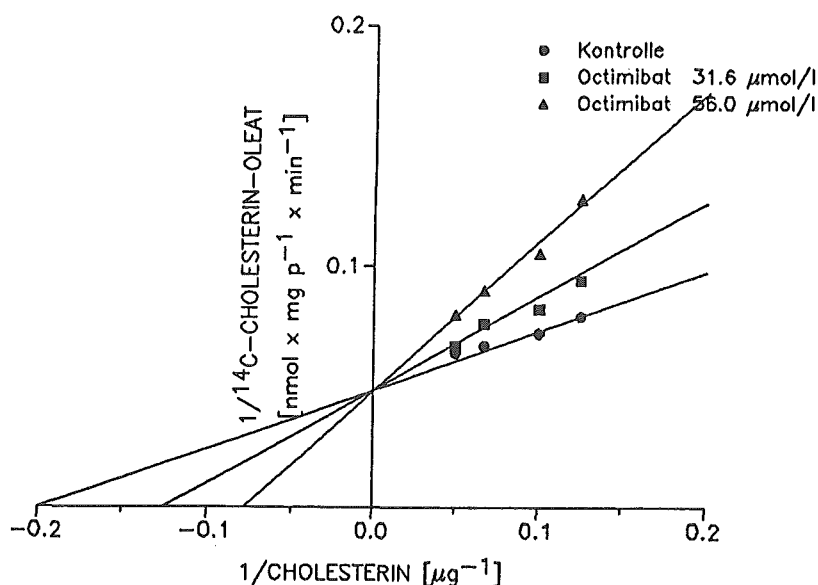


Abb. 4.40: Lineweaver-Burk-Auswertung des Einflusses der Cholesterinkonzentration auf den inhibitorischen Effekt von Octimibat auf die ACAT- Aktivität in mikrosomalen Membranen aus Rattenleber. Exogenes Cholesterin, gelöst in Triton WR 1339, wurde, wie angegeben, den mikrosomalen Proteinen (100 µg) in 0,1 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, welcher 0,1 % PPC enthielt, zugesetzt und der Ansatz 20 min bei 37 °C vorinkubiert. Das Cholesterin/Triton-Verhältnis war dabei konstant 1:10 ( w/w). Anschliessend wurde Octimibat zugesetzt und weitere 10 min inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 3,7 kBq <sup>14</sup>C-Oleoyl-CoA in 0,1 % PPC (in obigen Phosphatpuffer) gestartet; die Endkonzentration von Oleoyl-CoA betrug 60 µmol/l bei einem Inkubationsvolumen von 200 µl. Gestoppt wurden die Reaktionen nach 20 min durch Zugabe von 1 ml Ethanol, welches <sup>3</sup>H-Cholesterinoleat (0,05 µCi) als internen Standard enthielt. Nach Extraktion mit 3 ml n-Hexan und Zentrifugation wurde die organische Phase unter Stickstoffgasstrom getrocknet, der Extrakt auf Whatman-Kieselgelplatten LK5D aufgetragen und in n-Hexan/ Diethylether/ Essigsäure = 85:15:1 (v/v) entwickelt. Die Detektion der radioaktiven Zonen erfolgte durch Radiophotographie (β-Kamera, Fa. Berthold); nach Markierung wurden die radioaktiven Bereiche ausgekratzt und in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1219) mit einem implementierten Meßprogramm für Doppelmarkierungen quantifiziert.

Tab. 4.12: Typ der ACAT-Inhibition und  $K_i$ -Werte von Octimibat und NAT 06-209.

Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zu Abb. 4.40 beschrieben, durchgeführt. Cholesterin bzw. Oleoyl-CoA wurden mit 20  $\mu\text{g}$  bzw. 60  $\mu\text{mol/l}$  als konstante Konzentrationen eingesetzt. Die Konzentration des jeweils anderen Substrats wurde variiert. Der Inhibitionstyp wurde aus den graphischen Auftragsungen nach Lineweaver-Burk bzw. Dixon bestimmt.  $K_i$ -Werte wurden aus den Dixon-Plots und aus den Steigungen der Lineweaver-Burk-Plots nach graphischer Darstellung errechnet.

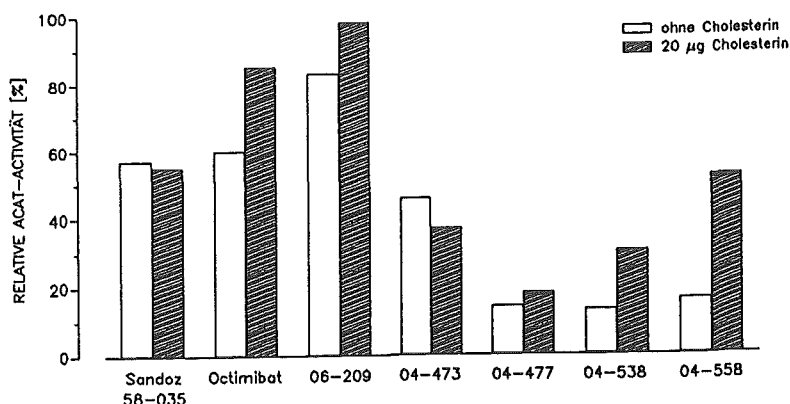
Substanz	Substrat		Inhibitions- typ	Inhibitor- Konstante $K_i$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]
	variabel	konstant		
Octimibat	Oleoyl-CoA	Cholesterin	kompetitiv	200
	Cholesterin	Oleoyl-CoA	kompetitiv	20-40
NAT 06-209	Oleoyl-CoA	Cholesterin	kompetitiv	> 300
	Cholesterin	Oleoyl-CoA	kompetitiv	50

Bei sättigender Oleoyl-CoA-Konzentration ist die Inhibitor-Konstante gegenüber Cholesterin hingegen eine Zehnerpotenz geringer. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß der primäre Angriffspunkt dieser Substanzen die Cholesterin-Bindungsstelle und nicht die Oleoyl-CoA-Bindungsstelle am Enzymprotein ist. Die Unterschiede in den  $K_i$ -Werten von Octimibat und NAT 06-209 spiegeln die unterschiedlich inhibitorische Potenz beider Substanzen wider.

Die kompetitive Hemmung von Enzymen durch Pharmaka bietet im Vergleich zu nicht kompetitiver oder unkompetitiver Hemmung den Vorteil, daß sie reversibel ist und damit schnell durch Veränderung der physiologischen Verhältnisse, d.h. durch Änderung der Substrat- bzw. Metabolit-Konzentration reguliert werden kann. Unter dem Aspekt der Bedeutung der ACAT für den Cholesterin-Stoffwechsel der Leber ist eine drastische, nicht reversible Hemmung nicht wünschenswert, da über ein exzessiven Anstieg der Menge freien Cholesterins in der Leber und der damit verbundenen stimulierten Exkretion über die Galle das Risiko der Gallensteinbildung zunimmt. Bei einer kompetitiven Hemmung der ACAT kann die Inhibitionswirkung durch

Zunahme der Konzentration freien Cholesterins aufgehoben werden.

Aus diesen Gründen wurden weitere ACAT-Inhibitoren daraufhin überprüft, ob die inhibitorische Potenz von der Cholesterinkonzentration im Reaktionsmedium abhängig ist, ob es sich also um eine kompetitive Inkubation handelt. Neben Octimibat nahm auch in Gegenwart von NAT 06-209 (Octimibat-Metabolit), NAT 04-538 und NAT 04-558 die Inhibitionswirkung mit zunehmender Cholesterinkonzentration ab, während NAT 04-473 und die Sandoz-Substanz 58-035 eine von der Konzentration an Akzeptor-Substrat unabhängige inhibitorische Potenz zeigten (Abb. 4.41). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß es sich bei NAT 06-209, 04-538 und 04-558 um potentiell kompetitive Inhibitoren der ACAT handelt. Es kann dabei allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß diese Substanzen auch die Bindung des Donor-Substrates Oleoyl-CoA an das Enzymprotein beeinflussen, so daß der Einfluß der Cholesterinkonzentration auf die inhibitorische Potenz unterschiedlich ist. Dieser Aspekt gewinnt insofern an Bedeutung, da die in Abb. 4.40 dargestellten Versuche mit Oleoyl-CoA mit sättigenden Konzentrationen durchgeführt wurden. NAT 04-473 und die Sandoz-Substanz 58-035 scheinen nicht mit Cholesterin um die Cholesterin-Bindungsstelle am Enzym zu kompetitieren. Weitergehende Untersuchungen unter Einbeziehung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Donorsubstrat-Konzentration sind notwendig, um im Einzelfall die inhibitorischen Eigenschaften von Substanzen genauer zu charakterisieren. Dennoch bietet die Durchführung dieses ACAT-Tests mit zwei verschiedenen Cholesterinkonzentrationen die Möglichkeit, erste Hinweise auf potentiell kompetitive oder nicht- bzw. unkompetitive Hemmung zu erhalten.



**Abb. 4.41:** Einfluß der Cholesterinkonzentration im Reaktionsansatz auf die inhibitorische Potenz verschiedener ACAT-Inhibitoren.

Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zu Abb. 4.40 beschrieben, durchgeführt. Oleoyl-CoA wurde in einer Konzentration von 20 µmol/l, exogenes Cholesterin - wie angegeben - in einer Menge von 20 µg zugesetzt.

Tabelle 4.13 zeigt repräsentativ Screening-Ergebnisse, die in dem Modell "Inhibition der ACAT" erzielt worden sind und hier diskutiert werden sollen. Die Reduktion der inhibitorischen Wirkung durch die Zugabe von exogenem Cholesterin im Überschuß deutet auf einen kompetitiven Anteil der Inhibition durch Prüfsubstanzen hin. Der Einfluß von Cholesterin auf die inhibitorische Potenz ist unterschiedlich und läßt vermuten, daß diese Substanzen ebenfalls die Bindung von Oleoyl-CoA an das Enzymprotein beeinflussen. Unter diesem Aspekt muß berücksichtigt werden, daß bei Zweisubstratreaktionen in der Regel die Veränderung der Konzentration eines Substrates zu einer Veränderung der Affinität des Enzyms zum zweiten Substrat führt.

Um die inhibitorischen Eigenschaften von Substanzen genauer zu charakterisieren, ist daher eine Bestimmung des Hemmtyps und der Inhibitionskonstanten unter definierten kinetischen Bedingungen unerläßlich.

Tab. 4.13: Der Einfluß von Referenzsubstanzen und Substanzen, die in unseren chemischen Laboratorien synthetisiert wurden, auf die ACAT-Aktivität in mikrosomalen Membranen von Rattenleber.

Mikrosomale Proteine (100 µg) wurden in 160 µl 0,1 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, welcher 0,1 % Polyenyl-Phosphatidylcholin (PPC) und, wenn angegeben, 20 µg exogenes Cholesterin in Triton WR 1339 gelöst (Triton/Cholesterinverhältnis 10:1, w/w) enthielt, 20 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Substanzen wurden in DMSO oder Wasser gelöst zugesetzt, danach weitere 10 min inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 3,7 kBq <sup>14</sup>C-Oleoyl-CoA in 0,1 % PPC (in obigem Phosphatpuffer) gestartet; die Endkonzentration an Oleoyl-CoA betrug 20 µmol/l bei einem Inkubationsvolumen von 200 µl. Gestoppt wurden die Reaktionen nach 15 Min. durch Eiskühlung der Proben und Zugabe von 1 ml Ethanol, welches <sup>3</sup>H-Cholesterinoleat (0,05 µCi) als internen Standard enthielt. Nach Extraktion mit 3 ml n-Hexan und Zentrifugation wurde die organische Phase unter Stickstoffgasstrom getrocknet, der Extrakt auf Whatman-Kieselgelplatten LK5D aufgetragen und in n-Hexan/ Diethylether/ Essigsäure = 85:15:1 (v/v) entwickelt. Die Detektion der radioaktiven Zonen erfolgte durch Radiophotographie (β-Kamera, Fa. Berthold); nach Markierung wurden die radioaktiven Bereiche ausgekratzt und in einem Flüssigszintillationszähler (LKB 1219) mit einem implementierten Meßprogramm für Doppelmarkierungen quantifiziert.

Substanz	Inhibition [%]	
	- Cholesterin	+ Cholesterin
NAT 04-534	44	14
NAT 04-543	47	20
NAT 04-557	61	48
NAT 04-544	85	72
NAT 04-590	82	53
NAT 04-591	64	43
NAT 04-593	89	66
NAT 04-592	93	73
NAT 04-599	81	57
NAT 04-643	75	54
NAT 04-611	82	54

Diese Untersuchungen wurden zunächst für drei weitere Substanzen durchgeführt (Tab. 4.14). Bei der Bestimmung des Hemmtyps gegen das entsprechende variable Substrat wurden jeweils konstante Konzentrationen des anderen Substrates eingesetzt, um einerseits konzentrationsabhängige Einflüsse auf die Reaktion zu vermeiden und um andererseits im Falle einer

kompetitiven Hemmung Interaktionen mit beiden Bindungsstellen gleichzeitig auszuschließen.

**Tab. 4.14: Typ der ACAT-Inhibition und  $K_i$ -Werte von ACAT-Inhibitoren.**

Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zu Tab. 4.13 beschrieben, durchgeführt. Cholesterin bzw. Oleoyl-CoA wurden bei den Inkubationen mit konstanten Konzentrationen mit 20  $\mu\text{g}$  bzw. 60  $\mu\text{mol/l}$  eingesetzt. Die Konzentrationen des jeweils anderen Substrates wurden variiert. Der Typ der Inhibition und die  $K_i$ -Werte wurden aus den Dixon-Plots errechnet.

Substanz	Substrate		Typ der Inhibition	Inhibitor-Konstante [ $\mu\text{mol/l}$ ]	
	variabel	konst.		$K_i$	$K_i'$
NAT 04-544	Cholesterin	Oleoyl-CoA	gemischt	5	32
	Oleoyl-CoA	Cholesterin	nicht-kompetitiv	-	10
NAT 04-538	Cholesterin	Oleoyl-CoA	gemischt	28	41
	Oleoyl-CoA	Cholesterin	nicht-kompetitiv	-	23
Melinamid	Cholesterin	Oleoyl-CoA	unkompetitiv	-	5.0
	Oleoyl-CoA	Cholesterin	unkompetitiv	-	2.2

NAT 04-544 und NAT 04-538 wurden aufgrund des Einflusses von Cholesterin auf die Inhibitionswirkung im mikrosomalen ACAT-Test als potentiell kompetitiv eingestuft. Melinamid (ACAT-Inhibitor der Fa. Sumitomo) hingegen zeigte keine Beeinflussung seiner inhibitorischen Potenz durch Erhöhung der Cholesterin-Konzentration. Wie die Tabelle verdeutlicht, handelt es sich bei der Interaktion von NAT 04-544 und NAT 04-538 mit der Cholesterin-Bindungsstelle um einen gemischten Hemmtyp, gegenüber Oleoyl-CoA um einen nicht-kompetitiven Hemmtyp.

Die nicht-kompetitive Hemmung wird dadurch charakterisiert, daß der Inhibitor sowohl mit dem freien Enzym als auch mit dem Enzym-Substrat-Komplex reagieren kann. Die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes  $K_i$  und des Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes  $K_i'$  sind gleich. Dieser Fall kann eigentlich als Spezialfall der sogenannten gemischten Hemmung betrachtet werden. Bei dieser sind die beiden Inhibitionskonstanten nicht identisch, d.h., die Affinität des Enzyms zum Inhibitor wird durch die Bindung des Substrates verändert.



Wenn  $K_i < K_i'$  ist, enthält die Hemmung kompetitive und nicht-kompetitive Anteile. Dies bedeutet, daß besonders die Hemmung durch NAT 04-544 aufgrund des im Vergleich zum  $K_i'$ -Wert niedrigen  $K_i$ -Wertes eine relativ hohe Affinität für das freie Enzym besitzt, d.h., die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion wird vermindert und der  $K_m$ -Wert steigt.

Die Unterschiede in den  $K_i$ -Werten von NAT 04-538 und NAT 04-544 spiegeln die unterschiedliche inhibitorische Potenz beider Substanzen hinsichtlich der Cholesterin-Bindung am freien Enzym wieder.

Melinamid als unkompetitiver Inhibitor sowohl gegenüber Cholesterin als auch gegenüber Oleoyl-CoA reagiert ausschließlich mit dem Enzym-Substrat-Komplex unter Bildung eines katalytisch inaktiven sogenannten Dead-End-Komplexes. Maximalgeschwindigkeit und  $K_m$ -Wert nehmen ab.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß die Bestimmung des Einflusses von Prüfsubstanzen in Abhängigkeit von der Cholesterin-Konzentration auf die ACAT-Aktivität mikrosomaler Membranen geeignet ist, Hinweise auf potentiell kompetitive oder nicht- bzw. unkompetitive Hemmung zu erhalten.

Beim Arbeiten mit mikrosomalen Membranen, lipophilen Substanzen und Detergentien können folgende Probleme auftreten:

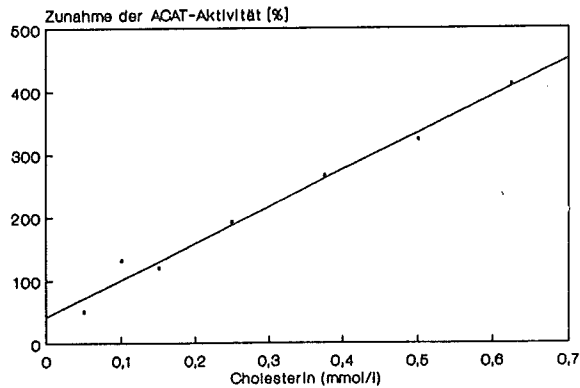
- Die Verwendung von Detergenz kann zu einer Veränderung der enzymatischen Aktivität der ACAT führen. Diese Veränderung hängt von der Konzentration des Detergenz und von dem Verhältnis Cholesterin/Detergenz ab.
- Der Inhibitor selbst kann Detergenz-ähnliche Eigenschaften besitzen und dadurch die Aktivität der ACAT unspezifisch beeinflussen.
- Inhibitor und Detergenz können gemischte Mizellen bilden.

Um mögliche unerwünschte Einflüsse vom Detergenz auszuschließen und um einen besser reproduzierbaren ACAT-Test in Hinblick auf Cholesterin als Substrat zu gelangen, können folgende Methoden in Betracht gezogen werden:

1. Inkubation von mikrosomalen Membranen mit Cholesterin-haltigen Liposomen zur Erhöhung der Cholesterin-Konzentration in den Membranen
2. Solubilisierung der ACAT aus mikrosomalen Membranen und Rekonstitution in Cholesterin/Phosphatidylcholin-Liposomen.

Zunächst wurde die erste Methode (s. 4.6.2.2.3) auf ihre Verwendbarkeit hinsichtlich einer Veränderung der Cholesterin-Konzentration in den mikrosomalen Membranen der Rattenleber hin überprüft.

Abbildung 4.42 zeigt den Einfluß von Cholesterin-haltigen Liposomen auf die Aktivität der ACAT bei einem konstanten molaren Verhältnis von Cholesterin/Phosphatidylcholin (1:1). Mit steigender Cholesterin-Konzentration in den Liposomen wurde eine lineare Zunahme der Aktivität der ACAT bis zu einer Cholesterin-Konzentration von 2,5  $\mu\text{mol/ml}$  Liposomenlösung verzeichnet. Dies entspricht unter den gegebenen experimentellen Bedingungen einer Cholesterin-Konzentration von 0,625  $\mu\text{mol/ml}$  bzw. 48  $\mu\text{g}$  im Reaktionsansatz. Wie die Abbildung verdeutlicht, konnte in dem geprüften Konzentrationsbereich keine Sättigung des Enzyms mit Cholesterin erreicht werden, trotz maximaler Konzentration von 48  $\mu\text{g}$  Cholesterin im Ansatz im Vergleich zu der in den mikrosomalen Membranen normalerweise vorliegenden Konzentration von 3-4  $\mu\text{g}$  Cholesterin/100  $\mu\text{g}$  Protein. Es ist zu vermuten, daß das in Liposomenform zugegebene Cholesterin der ACAT als Substrat nicht in vollem Maße verfügbar ist.

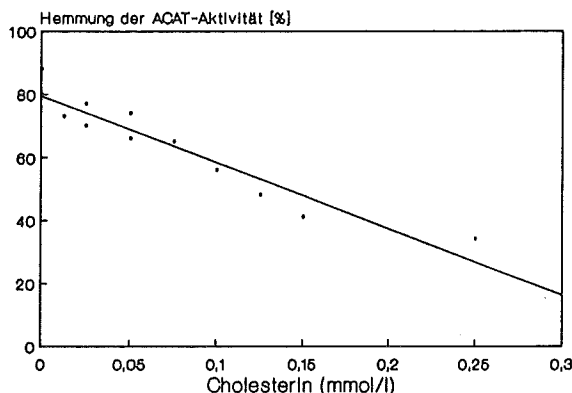


**Abb. 4.42:** Steigerung der ACAT-Aktivität in mikrosomalen Membranen aus Rattenleber durch Zusatz Cholesterin-reicher Liposomen. Der ACAT-Assay wurde, wie im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben, durchgeführt. Zusätzlich wurden 50  $\mu$ l Cholesterin-reiche Liposomen bei einem konstanten molaren Cholesterin-Phosphatidylcholin-Verhältnis von 1:1 zugesetzt.

Analog zu den Untersuchungen mit Cholesterin/Detergenz-Kombinationen sollte weiterhin geprüft werden, welchen Einfluß die Zugabe von Cholesterin in Liposomenform auf die Inhibition der ACAT durch entsprechende Inhibitoren hat. Exemplarisch wurde zunächst der Inhibitor Octimibat ausgewählt, der sich bei vorangegangenen enzymkinetischen Untersuchungen in Anwesenheit von Triton WR 1339 als kompetitiv erwies. Abbildung 4.43 demonstriert das Ergebnis. Mit zunehmender Cholesterin-Konzentration im Inkubationsansatz wurde eine Abnahme der Inhibition bei konstanter Inhibitorkonzentration bestimmt. Dies deutete auf eine Verdrängung des Inhibitors durch Cholesterin hin und korreliert somit gut mit den mit der Konzentration Cholesterin/Triton WR 1339 erhaltenen Ergebnissen. Ein direkter quantitativer Vergleich und eine Bestimmung der Inhibitionskonstanten gegenüber zugesetztem Cholesterin in Liposomenform ist aus folgenden Gründen nicht möglich:

1. Die verfügbare Cholesterin-Konzentration für die ACAT in beiden Systemen ist nicht direkt meßbar

## 2. Fehlende Sättigungskinetik (Michaelis-Menten-Kinetik) in Anwesenheit von Cholesterin in Liposomenform



**Abb. 4.43:** *Einfluß Cholesterin-reicher Liposomen auf die Inhibition der ACAT in mikrosomalen Membranen aus Rattenleber durch Octimibat. Der ACAT-Assay wurde, wie im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben, durchgeführt. Mikrosomale Membranen wurden in Gegenwart von Cholesterin-reichen Liposomen bei einem konstanten molaren Cholesterin-Phosphatidylcholin-Verhältnis von 1:1 für 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Nach Zusatz von Octimibate (30 µmol/l) wurde weitere 10 min inkubiert.*

Tabelle 4.15 dokumentiert einen Vergleich des Einflusses der Cholesterin-Konzentration auf die Inhibition der ACAT durch Octimibat in Membranpräparationen, deren Cholesterin-Gehalt einerseits durch Zugabe von exogenem Cholesterin zum Reaktionsansatz, andererseits durch Fütterung Cholesterin-reicher Diät in vivo verändert wurde.

Ein Vergleich der Ergebnisse zeigt, daß die Veränderung der Cholesterin-Konzentration in mikrosomalen Membranen durch Zugabe von exogenem Cholesterin mittels Detergenz oder Liposomen geeignet ist, kompetitive Inhibitoren gegenüber Cholesterin qualitativ und relativ zueinander quantitativ zu charakterisieren. Die Fütterung Cholesterin-reicher Diät an Tiere zur Erhöhung des Membrancholesterins und die Gewinnung von mikrosomalen Membranen aus diesen Tieren liefert keine wesentlich andere Aussage und ist somit nicht nötig.

*Tab. 4.15: Einfluß unter verschiedenen experimentellen Bedingungen exogen zugesetzten Cholesterins bzw. des Cholesterin-Gehaltes mikrosomaler Membranen aus Rattenleber auf den inhibitorischen Effekt von Octimibat auf die ACAT-Aktivität.*

*Der ACAT-Assay wurde wie im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben, durchgeführt.*

*Der Cholesterin-Gehalt der mikrosomalen Membranen konnte durch 5tägige Fütterung einer Cholesterinreichen Diät (1,5 % Cholesterin, 0,5 % Cholsäure) von 3,5 µg/100 µg Membranprotein auf 7,4 µg/100 µg Membranprotein erhöht werden.*

experimentelle Bedingungen	% ACAT Inhibition in Gegenwart von 30 µmol/l Octimibat
1. Membranen + Triton WR 1339	
ohne	50
mit 20 µg exog. Cholesterin/Test	9
2. Membranen + Liposomen	
ohne	80
mit 20 µg exog. Cholesterin/Test	30
3. Membranen	
Normaldiät	87
Cholesterinreiche Diät	25

#### **4.7 Bestimmung der HDL-Rezeptordichte an Makrophagen**

##### **4.7.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Über acetyliertes LDL mit Cholesterin beladene Maus-Peritonealmakrophagen weisen ein erhöhtes Bindungsvermögen für Lipoproteine hoher Dichte (HDL) auf. Inkubiert man diese Zellen in Gegenwart von  $^{125}\text{J}$ -HDL<sub>3</sub>, so läßt sich nach Abspülen der nicht gebundenen Radioaktivität das an die Zellmembranen gebundene bzw. aufgenommene HDL<sub>3</sub> in einem Gamma-Counter erfassen und liefert damit eine Aussage über die HDL-Rezeptordichte. Prüfsubstanzen können zu einer weiteren Zunahme der HDL-Rezeptoren führen und damit potentiell antiatherosklerotisch wirksam sein, da durch eine verstärkte Bindung und Aufnahme von Lipoproteinen hoher Dichte mehr Cholesterin aus der Gefäßwand in die Leber zurücktransportiert, also der "reverse cholesterol transport" stimuliert wird.

##### **4.7.2 Material und Methoden**

###### **4.7.2.1 Zellen**

Folgende Makrophagen-ähnlichen Zelllinien (Spendertier: Maus) wurden bei der "American Type Culture Collection (ATCC)" bezogen und auf ihre Eignung als Ersatz für Maus-Peritonealmakrophagen bei HDL-Bindungsuntersuchungen hin untersucht:

Bezeichnung	Bestellnummer
IC21	TIB 186
J774A.1	TIB 67
PU5-1R	TIB 61

Die Zellen sind in 10 %igem DMSO in Kulturmedium bei -196 °C mit unbekannter Passagenzahl kryokonserviert.

Darüberhinaus fanden frisch angelegte Primärkulturen von Peritonealmakrophagen der Maus Verwendung.

#### 4.7.2.2 Kulturmedium und Puffer

##### a) Kulturmedium, Medienadditiva und Antibiotika:

1. Minimum Essential Medium, nach Dulbecco (DMEM, Boehringer Mannheim Nr. 210048)
2. Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ , Merck Nr. 6323)
3. Streptomycinsulfat (Serva, Nr. 35500)
4. Penicillin G-Kaliumsalz (Serva, Nr. 31749)
5. Fötale Kälberserum (FKS, Seromed, verschiedene Chargen)
6. Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA, 100fach konzentriert, Boehringer Mannheim, Nr. 210293)
7. Natriumpyruvat (Seromed, Nr. L0473)
8. L-Glutamin (Boehringer Mannheim, Nr. 210277)
9. Rinderserumalbumin (BSA, Sigma A7906)

DMEM Pulverkonzentrat (für 5 l Medium)

- + 18,5 g  $\text{NaHCO}_3$
- + 0,5 g Streptomycinsulfat
- + 0,3 g Penicillin G (500.000 IU)

werden mit bidest. Wasser auf 5 l aufgefüllt und nach 15 - 30minütigem Rühren sterilfiltriert (Filter 0,2  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schüll, Nr. 401352).

Die NEAA, Natriumpyruvat und L-Glutaminlösungen werden vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Das FKS wird zur Inaktivierung von Proteasen zwei Stunden bei 56 °C hitzeinaktiviert und vor Gebrauch 10 %ig (v/v) dem Flüssigmedium zugesetzt.

BSA wird als sterile 10 %ige Stammlösung in bidest. Wasser bei 4 °C gelagert und dem Flüssigmedium vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Als DMEM-Medium wird grundsätzlich das Nährmedium einschließlich  $\text{NaHCO}_3$ , NEAA, L-Glutamin, Natriumpyruvat und Antibiotika bezeichnet. Alle anderen Zusätze (FKS, BSA, LDL) werden gesondert aufgeführt.

**b) Zusammensetzung des PBS-Puffers**

Zum Waschen der Zellen bei den Bindungsinkubationen wird "phosphate buffered saline" (PBS) verwendet:

- 8,0 g NaCl (Merck, Nr. 6404)
- 0,2 g KCl (Merck, Nr. 4936)
- 1,15g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma, Nr. S0876)
- 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Nr. 4873)

werden mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt - der pH-Wert der Lösung beträgt 7,0.

**4.7.2.3 Subkultivierung der Makrophagen-Zelllinien**

Alle im folgenden beschriebenen Arbeitsgänge erfolgen unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank, sterile Verbrauchsware, Pipetten):

1. Medium absaugen
2. 3 ml PBS-Puffer zusetzen (bei NUNC-Petrischalen, d=10 cm, Nr. 150350)
3. Die Zellen mittels sterilem Gummiwischer vorsichtig abschaben
4. Zentrifugation der Zellsuspension bei 2.000 Upm (Labofuge 6000, Heraeus), 1 min
5. Absaugen des Überstandes, suspendieren des Zellpellets in 5 ml DMEM/10 % FKS
6. Zentrifugation wie 4.
7. Überstand absaugen, Zellpellet in 5 ml DMEM/10 % FKS aufnehmen und auf fünf neue Petrischalen verteilen, in denen 10 ml DMEM/10 % FKS vorgelegt werden.

**4.7.2.4 Einfrieren der Makrophagen-Zelllinien**

Punkt 1.-6. wie unter 4.7.2.3 beschrieben  
Dann weiter:

7. Pellet in 1 ml DMEM/10 % FKS/10 % DMSO suspendieren und in eine Ampulle (NUNC, Nr. 363401) pipettieren
8. Mit Einfrierstopfen (Union Carbide) auf Position "G" 2 Stunden im Stickstoffbehälter belassen, danach alle 15 min eine Position tiefer setzen.



#### 4.7.2.5 Isolierung von Peritonealmakrophagen der Maus

Für die Isolierung von Peritonealmakrophagen zur Herstellung von Primärkulturen werden NMRI-Mäuse (männlich, ca. 20 g; Züchter Hagemann) verwendet.

Nach dem Töten der Maus in Etherdampf wird diese mit ausgestreckten Extremitäten auf einer Unterlage befestigt. Die Bauchhaut wird mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und anschließend vom Brust- bis zum Bauchraum abpräpariert, ohne die darunterliegende Muskulatur zu verletzen. In den inneren Bauchraum werden 4 ml 0,9 %ige NaCl + 0,5 E Liquemin (Hoffmann LaRoche) steril injiziert, ohne Organe zu verletzen. Der Bauchraum wird massiert, dann die Muskelschicht abgehoben, etwas eingeschnitten und die NaCl-Lsg. mit den Zellen mit einer sterilen Pasteurpipette aufgesogen und in ein steriles Röhrchen überführt.

Die Peritonealspülungen von 3 Mäusen werden in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt, 5 min bei 2.000 U/min zentrifugiert und der Überstand gut abgesaugt. Die Zellen werden in DMEM (10 % FKS) resuspendiert (1 ml Medium/Röhrchen) und auf die entsprechenden Multischalen verteilt. Es werden jeweils die Zellen von 2 Mäusen auf einer Multischaleneinheit zusammengefaßt (Konzentration der Zellen ca.  $1-3 \times 10^6$  Zellen).

#### 4.7.2.6 Präparation von humanen High-Density-Lipoproteinen (HDL<sub>3</sub>)

Human-Vollblut der Blutbank Köln (Antikoagulanzen : Citrat) wird in einer Laborzentrifuge (Labofuge 6000, Heraeus) 15 min bei 3.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand (Citrat-Plasma) wird mit Kaliumbromid (KBr, Merck, Nr. 4905) auf eine Dichte von 1,02 g/ml eingestellt und wie folgt zentrifugiert: Ultrazentrifuge L8-70M und 70Ti-Rotor, Quickseal-Röhrchen, Fa. Beckman, 16 h, 65.000 Upm, die Trennung erfolgt bei 4 °C.

Es werden 10 ml Überstand (VLDL, Chylomikronen) mittels Pasteurpipette abgenommen und verworfen.

Die untere Phase wird mit KBr auf eine Dichte von 1,063 g/ml eingestellt und erneut unter oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Die oberen 5-8 ml (je nach LDL-Gehalt des

Plasmas) werden mittels Pasteurpipette abgenommen und nach der Dialyse gegen unten aufgeführten Puffer zur Acetylierung (4.7.2.7) eingesetzt.

Die untere Phase wird mit KBr auf eine Dichte von 1,125 g/ml eingestellt und erneut unter oben beschriebenen Bedingungen - jedoch mindestens 36 h lang - zentrifugiert. Die oberen 5-8 ml (je nach HDL<sub>2</sub>-Gehalt des Plasmas) werden mittels Pasteurpipette abgenommen und verworfen.

Die untere Phase wird mit KBr auf eine Dichte von 1,21 g/ml eingestellt und erneut unter den bei der HDL<sub>2</sub>-Abtrennung beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Die oberen 5-8 ml (je nach HDL<sub>3</sub>-Gehalt des Plasmas) werden mittels Pasteurpipette abgenommen, und gegen folgenden Puffer dialysiert:

36,0 g Natriumchlorid (NaCl, Merck Nr. 6404)

1,5 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Sigma Nr. ED2SS)

1,2 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Sigma Nr. S0876)

werden mit vorgekühltem (4 °C) bidest. Wasser auf 4 l aufgefüllt (pH 7,2). Der Dialysepuffer wird jeweils frisch angesetzt, wobei für 100 ml HDL<sub>3</sub>-Präparation achtmal 4 l Dialysepuffer eingesetzt werden - die Dialyse erfolgt über insgesamt 2 Tage. Es wird ein Dialyseschlauch mit einer Ausschlußgrenze von 10.000 g/mol (Serva Nr. 44110) eingesetzt.

Nach einer Proteinbestimmung nach Lowry wird das HDL<sub>3</sub> sterilfiltriert (0,2 µm, Einwegfilterhalter, Sartorius, Nr. 16534 K) - die maximale Haltbarkeit beträgt 8 Wochen.

#### **4.7.2.7 Herstellung von acetylierten LDL**

1 ml LDL-Lösung (10-16 mg Protein/ml) und 1 ml gesättigte Natriumacetatlösung werden im Eisbad gerührt. Es ist darauf zu achten, daß die gesamte Lösung ständig in Bewegung ist.

Man läßt Acetanhydrid langsam (etwa 3 µl/5 min) zutropfen, wobei die benötigte Menge nach folgender Regel ermittelt wird: mg LDL-Protein x 1,5 = µl Acetanhydrid.

Nach Zugabe des gesamten Acetanhydrids wird die gesamte Lösung noch weitere 30 min gerührt.

Über Nacht wird gegen

0,9 % NaCl

0,3 mmol/l EDTA; pH 7,4, 4 °C

dialysiert und die Dialyseflüssigkeit mehrmals gewechselt.

Zur Kontrolle wird anschließend eine Agarose-Elektrophorese durchgeführt. Bei erfolgreicher Acetylierung der LDL kann die Proteinbande der Acetyl-LDL bei einem höheren  $R_f$ -Wert (etwa auf der Höhe der HDL) lokalisiert werden. Andernfalls schmieren die Bande vom Start an, was auf eine Denaturierung der LDL hinweist.

#### 4.7.2.8 Präparation von apoE-armen HDL<sub>3</sub>

Für die Bindungsstudien werden apoE-arme HDL<sub>3</sub> als Tracer eingesetzt:

a) *Puffer (pH 7,4) zur Präparation von apoE-armen HDL<sub>3</sub>:*

Puffer 1: 0,05 mol/l NaCl (Merck, Nr. 6404)

0,025 mol/l MnCl<sub>2</sub> (Sigma, Nr. M3634)

5 mmol/l Natriumacetat (Merck, Nr. 6720)

Puffer 2: 0,29 mol/l NaCl

5 mmol/l Natriumacetat

b) *Vorbereitung und Durchführung der Säulenchromatographie:*

Heparin-Sepharose (Pharmacia, Nr. 17-0467-01) wird in "Puffer 1" gequollen (5 g Trockensubstanz ergeben 15 ml Gel), in eine Säulenvorrichtung (Pharmacia, Nr. 19-0870-01) gefüllt und mit 150 ml "Puffer 1" äquilibriert. Die dafür eingesetzte Schlauchpumpe (Pharmacia, Modell 2132-002) wird mit einer Flußrate von 30 ml/h betrieben. Die HDL<sub>3</sub>-Fraktion wird zweimal gegen je 1 l "Puffer 1" dialysiert und (ca. 10 mg HDL-Protein) in diesem Puffer über Nacht mit einem Flow von 10 ml/h über die Säule zirkuliert. Die nicht gebundene Fraktion (apoE-arme HDL<sub>3</sub>) wird gegen den unter 4.7.2.6 beschriebenen Dialysepuffer dreifach dialysiert und mittels Ultrafiltration (Fa. Amicon, Minicon-Zellen Typ B15) auf einen Proteingehalt von ca. 10 mg/ml aufkonzentriert.

Die Heparinsäule wird nach Regeneration mit 200 ml "Puffer 2" und anschließender Äquilibrierung gegen "Puffer 1" weitere viermal eingesetzt.

#### 4.7.2.9 Radiojodierung von apoE-armen HDL<sub>3</sub>

1 ml apoE-arme HDL<sub>3</sub> (Proteingehalt ca. 10 mg/ml) werden mit 20 Jodobeads (Pierce Chemical Company, Nr. 28666) und 10 µl (37 MBq) Na<sup>125</sup>I (DuPont/NEN, Nr. NEZ 033A) 20 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert.

Die HDL<sub>3</sub> werden von den Jodobeads getrennt, 1:1 (v/v) mit eiskalter 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt und sechsmal gegen 1 l dieser Lösung bei 4 °C dialysiert (24 h, Dialyseschlauch mit 10.000er Ausschlußgrenze, Serva, Nr. 44104). Die <sup>125</sup>I-HDL<sub>3</sub> werden nach einer Proteinbestimmung nach Lowry und einer Bestimmung der eingebauten Radioaktivität im Gammacounter (LKB, Rackgamma II, Modell 1270) steriltfiltriert (Einwegfilterhalter Sartorius, Nr. 16534K) und bei 4 °C gelagert; die maximale Haltbarkeit beträgt 3 Tage! Die spezifische Aktivität der Präparationen liegt im Bereich 200-300 cpm/ng Protein.

#### 4.7.2.10 Proteinbestimmung nach Lowry

##### Lösungen:

- Reagenz A: 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
0,1 mol/l NaOH
- Reagenz B: 1 % Kalium-Natrium-Tartrat  
0,5 % CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
einzeln lösen, dann zusammengeben
- Reagenz C: 50 Teile Reagenz A  
+ 1 Teil Reagenz B

##### Prüflösung:

- 100 µl Probe mit 2 ml Reagenz C gut mischen und 10 min stehen lassen.
- 100 µl Folin-Reagenz (Fa. Merck, Nr. 9001) zugeben, gut mischen und 30 min stehen lassen
- 100 µl Triton-X-100 (1 %ig in dest. Wasser) zugeben.
- Absorptionsbestimmung gegen Reagenz + Folin + Triton als

Leerwert im Spektralphotometer (Beckman, Modell 34) - Wellenlänge: 660 nm

Eichlösung:

0,1 % BSA-Lsg.

10-50 µl = 10 - 50 µg BSA/Ansatz

#### **4.7.2.11 Durchführung der HDL<sub>3</sub>-Bindungsexperimente**

Die Bindungsuntersuchungen werden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nr. 72693) durchgeführt, welche 24 h bei 37 °C mit PBS/0,1 % BSA vorinkubiert waren.

Zur HDL<sub>3</sub>-Bindung werden die mit 20 µg/ml acetylierten LDL beladenen und mit Substanzen behandelten Zellen mit einem Gummiwischer von den Kulturschalen abgeschabt, mit 0,5 ml PBS in die Eppendorfgefäße überführt und nach Versetzen mit 0,5 ml DMEM/0,1 % BSA/10 mg/ml <sup>125</sup>J-HDL<sub>3</sub> 30 min im Eisbad inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung werden drei Kontrollinkubationsansätze in Gegenwart von 1 mg/ml nicht-markierter HDL<sub>3</sub> durchgeführt.

Anschliessend werden die Zellen pelletiert (Beckman, Microfuge 12, 10.000 x g), zweimal mit PBS/0,1 % BSA und viermal mit PBS ohne BSA gewaschen (= suspendieren in 0,5 ml Waschpuffer, pelletieren mittels Zentrifugation) und die gebundene Radioaktivität im Gammacounter (LKB, Rackgamma II Modell 1270) quantifiziert. Nach Solubilisierung der Zellen mit 0,5 ml 0,5 mol/l NaOH wird ein 100 µl-Aliquot zur Proteinbestimmung nach Lowry eingesetzt.

#### **4.7.2.12 Auswertung der Bindungsstudien**

Bestimmt wird die spezifisch gebundene Masse apoE-ärmer HDL<sub>3</sub> durch Subtraktion der in Gegenwart eines 100fachen Überschusses an HDL<sub>3</sub> gebundenen Radioligandmenge von der Gesamtbindungs- menge bei den Kontroll- bzw. Substanzinkubationen. Die Radioaktivitätsdaten werden dabei immer auf das Zellprotein bezogen, wobei aus drei Inkubationsansätzen pro Substanz bzw. Konzentration der Mittelwert ermittelt wird. Die Substanzbedingte Beeinflussung der HDL<sub>3</sub>-Rezeptoraktivität wird als Differenz zur Kontrollinkubation prozentual ausgedrückt. Die

Auswertung erfolgt durch ein für diese Zwecke entwickeltes Computerprogramm (Programmiersprache: BASIC).

#### **4.7.3 Ergebnisse und Diskussion**

Dieser In-vitro-Test ist in Zusammenarbeit mit Priv.-Doz. Dr. Schmitz, Münster, aufgebaut und etabliert worden. Diesem Modell liegen folgende Vorstellungen zugrunde, die bereits experimentell sowohl im Labor von Dr. Schmitz als auch im Lipidlabor der Fa. Nattermann bestätigt werden konnten:

Die Inkubation von Maus-Peritonealmakrophagen mit acetylierten humanen Lipoproteinen geringer Dichte (Ac-LDL) führt neben einer Erhöhung der Bindungskapazität von HDL zu einer verstärkten Aufnahme und Speicherung von Cholesterin in Form von Cholesterinester. Dabei werden die aufgenommenen Cholesterinester zunächst in den Lysosomen unter Katalyse der sauren Cholesterinesterhydrolase (ACEH) hydrolysiert und das freie Cholesterin in das Zytoplasma transportiert, wo es durch das Enzym Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) reverestert und gespeichert wird. Da aber nur freies Cholesterin über die HDL abtransportiert werden kann, sorgt eine neutrale Cholesterinesterhydrolase (NCEH) für eine Cholesterinester-Spaltung und damit ein dynamisches Gleichgewicht zwischen unverestertem und verestertem Cholesterin.

Experimente mit den ACAT-Inhibitoren Octimibat und Sandoz 58-035 zeigten, daß diese Substanzen nicht nur das Gleichgewicht zwischen unverestertem und verestertem Cholesterin zugunsten des unveresterten, abtransportierbaren Cholesterins verschieben, sondern zusätzlich noch die HDL-Rezeptordichte erhöhen (Abb. 4.44). Dabei erwies sich allerdings die Sandoz-Substanz 58-035 in der eingesetzten Konzentration als zytotoxisch, so daß nach 6stündiger Inkubation die Bindungsrate niedriger als beim Kontrollexperiment ohne Substanz war. Ob die HDL-Rezeptordichte über die Menge unverestertem Cholesterins im Zytoplasma reguliert wird, kann an dieser Stelle nicht entschieden werden.

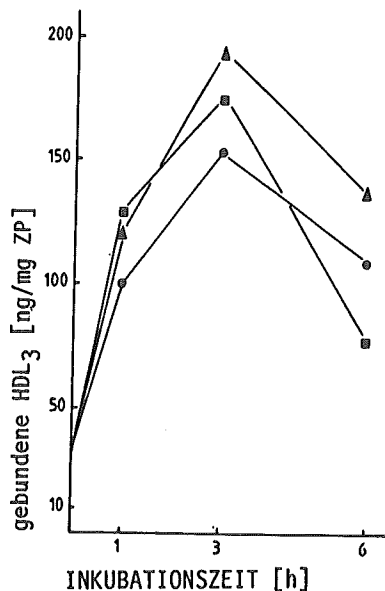


Abb. 4.44: Einfluß von ACAT-Inhibitoren auf die HDL-Bindung an Peritoneal-Makrophagen der Maus. Die Makrophagen wurden aus Mäusen mit 0,9 %iger NaCl-Lösung, welche 0,5 Einheiten Heparin enthielt, gewonnen und bei 37 °C in DMEM, welches 10 % fötales Kälberserum (FKS), 1 % nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA), 1 mmol/l Natriumpyruvat und 3 mmol/l L-Glutamin enthielt, im Brutschrank kultiviert. Nach 16 h wurde das FKS durch einen 0,2 %igen Zusatz an Rinderserumalbumin (BSA) ersetzt und die Zellen mit 20 µg/ml acetylierten LDL in Gegenwart der Testsubstanzen 20 h beladen. Die Zellen wurden zweimal mit einem PBS-Puffer, pH 7,4, welcher 0,2 % BSA enthielt, gewaschen und die adhärenen Zellen 1 h mit 20 µg/ml <sup>125</sup>J-HDL<sub>3</sub> (spezifische Radioaktivität: 125 cpm/ng Protein) in DMEM bei 4 °C (Eisbad) inkubiert. Sie wurden anschließend zweimal mit PBS-Puffer/ 0,2 % BSA und viermal mit PBS-Puffer ohne BSA gewaschen. Der Monolayer wurde in 0,5 mol/l NaOH solubilisiert und die Radioaktivität im Gammazähler (LKB, Model 1270) quantifiziert. Ein 100-µl-Aliquot diente der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951).

- acetylierte LDL (20 µg/ml)
- ▲ acetylierte LDL (20 µg/ml)  
+ Octimibat (10 µmol/l)
- acetylierte LDL (20 µg/ml)  
+ Sandoz 58-035 (NAT 04-436; 0,2 µmol/l)

Auch die Inkubation in Gegenwart des membrangängigen Dibutyl-ryl-cAMP erhöht die HDL-Bindungsrate bis zu einer Inkubationsdauer von 3 Stunden; ein ähnlicher Effekt läßt sich durch Motapizon erzielen, das - wie an Thrombozyten gezeigt

werden konnte - über eine Inhibition von Phosphodiesterasen (Kap. 3.8) die intrazelluläre Konzentration von cAMP erhöht (Abb. 4.45). Von cAMP ist bekannt, daß es in glatten Muskelzellen bzw. Endothelzellen die NCEH aktiviert und damit ebenfalls zur Bereitstellung einer größeren Menge an freiem Cholesterin führt.

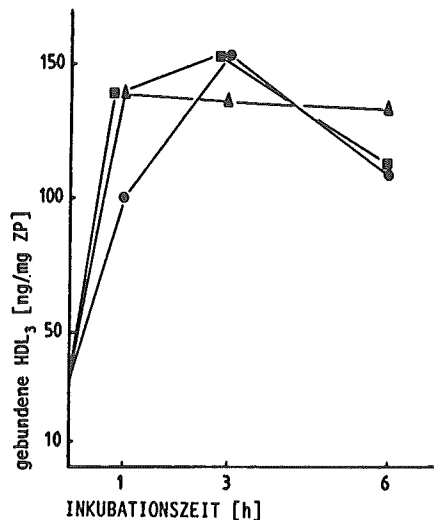


Abb. 4.45: Einfluß von Dibutyryl-cAMP bzw. Motapizone auf die HDL-Bindung an Peritoneal-Makrophagen der Maus.

Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zu Abb. 4.44 beschrieben, durchgeführt.

- acetylierte LDL (20 µg/ml)
- ▲ acetylierte LDL (20 µg/ml)  
+ Dibutyryl-cAMP (10 µg/ml)
- acetylierte LDL (20 µg/ml)  
+ Motapizone (10 µg/ml)

Um ein Routine-Screening mit diesem Modell ohne Tierverbrauch zu ermöglichen, wurden im Projektzeitraum permanente Makrophagen-Zelllinien auf ihre Fähigkeit hin untersucht, HDL spezifisch zu binden.

Durch Bindungsstudien an einem Peritonealmakrophagen-Monolayer nach Vorinkubation der HDL<sub>3</sub>-Fraktion mit Antikörpern gegen apoA-I, A-II, C-II, C-III oder apoE konnte gezeigt werden, daß nur apoA-I-Antikörper die Bindungsraten der Lipopro-



teine konzentrationsabhängig senken, was den Schluß auf einen apoA-I-HDL-Rezeptor impliziert (Schmitz, 1985a).

Aus diesem Grund wurde für unsere Untersuchungen mittels Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie ein apoE-armes und damit auch Cholesterin-armes HDL präpariert (Weisgraber, 1980), um unspezifische Bindungseffekte zu minimieren.

Ein grundlegendes Problem bei Bindungsuntersuchungen ist die elektrostatisch bedingte Anhaftung von peptidischen Liganden an das Plastikmaterial. Deshalb sollte man, um nicht die spezifische Bindungen innerhalb der Bestimmungsfehlerbreite untergehen zu lassen, nur mit konfluenten Zell-Monolayern arbeiten. Dies ist mit den sehr fest adhärierenden Peritonealmakrophagen der Maus leicht möglich, stellt jedoch beim Umgang mit Makrophagen-Zelllinien - vor allem wenn diese mit modifizierten LDL beladen und damit "gestresst" werden - ein nur schwer lösbares Problem dar. Aus diesem Grund wurden die Bindungsuntersuchungen nicht, wie beim LDL- bzw. ANP-Rezeptorassay (Kap. 4.9 bzw. 3.7), in der Kulturschale, sondern nach Abspülen der Zellen in mit Albumin (BSA) vorinkubierten Polyethylengefäßen (minimale Plastikbindung!) durchgeführt.

Neben Untersuchungen mit den Makrophagen-ähnlichen Zelllinien J774 und IC21 wurde nach den hervorragenden Ergebnissen mit der Mauslinie PU5-1R im Rahmen des "reverse cholesterol transport" (Kapitel 4.4 und 4.5) besonders diese näher untersucht.

Abbildung 4.46 zeigt die Zeitabhängigkeit der spezifischen HDL-Bindung, wobei sich analog zu den Ergebnissen im Peritonealmakrophagen-System ein dynamisches Gleichgewicht von Bindung bzw. Abspaltung des Liganden nach ca. 30 min einstellt. Bindungszeiten von mehr als einer Stunde gehen mit verminderter Bindung der apoE-armen HDL einher, was wahrscheinlich durch eine verminderte Vitalität der Zellen bei den Bindungsbedingungen (4 °C !) bedingt ist.

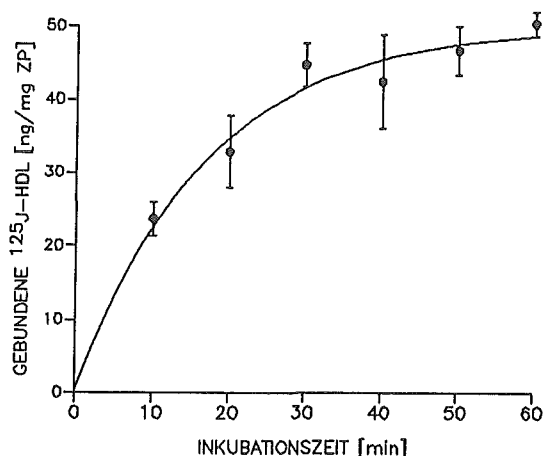


Abb. 4.46: Zeitabhängigkeit der Bindung von  $^{125}\text{J}$ -HDL an PU5-1R-Zellen.

PU5-1R-Zellen wurden für 16 h bei 37 °C in DMEM/ 1 % NEAA (Boehringer Mannheim)/ 0,1 % BSA vorinkubiert. Die Zellen wurden abgeschabt und die  $^{125}\text{J}$ -HDL-Bindungsstudie in Polyethylen-Reaktionsgefäßen, welche mit PBS/ 0,1 % BSA 24 h zur Minimierung der unspezifischen Bindung vorinkubiert waren, durchgeführt. Nach Zusatz von 10 µg/ml  $^{125}\text{J}$ -HDL (spez. Aktivität 250 cpm/ng Protein) wurde für die angegebenen Zeiten bei 4 °C (Eisbad) inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden Kontrollinkubationen in Gegenwart von 1 mg/ml nicht-markierter HDL durchgeführt.

Nach Sedimentation der Zellen durch Zentrifugation (3 min bei 8.000 x g; Beckman Microfuge 12) wurde das Pellet zweimal mit PBS/ 0,1 % BSA und zweimal mit PBS ohne BSA durch wiederholte Suspensions-Zentrifugationsschritte gewaschen.

Die Zellen wurden anschließend in 1 ml 0,5 mol/l NaOH solubilisiert und die Zell-assoziierte Radioaktivität im Gammazähler (LKB, Modell 1270) quantifiziert. Ein 100 µl-Aliquot diente der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951).

Angegeben sind die Mittelwerte der spezifischen Bindung  $\pm$  Standardabweichung.

ZP = Zellprotein

Hinweise auf eine spezifische Bindungsstelle liefert Abbildung 4.47, in der gezeigt wird, daß steigende Konzentrationen nicht-markierter HDL mit  $^{125}\text{J}$ -markierten HDL kompetieren. Der für solche Konkurrenzexperimente typische sigmoide Kurvenverlauf zeigt auch, daß die Bindungseigenschaften des Ligan-

den durch die gewählte Jodierungsmethode (Markwell, 1982) nicht beeinflusst werden.

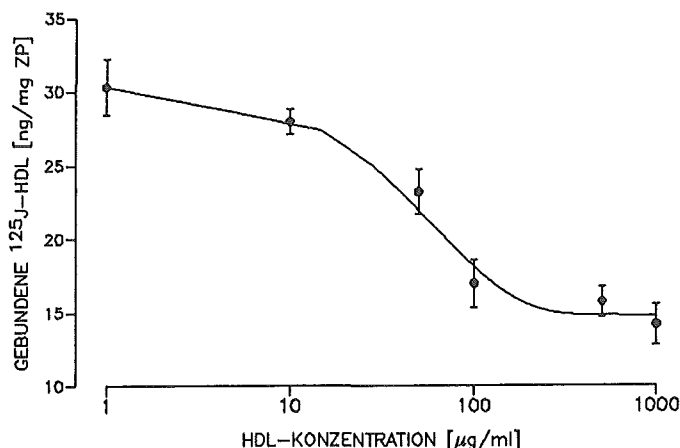


Abb. 4.47: Bindung von <sup>125</sup>J-HDL an PU5-1R-Zellen.

Vorinkubationen und Bindungsexperimente wurden, wie in der Legende zur Abb. 4.46 beschrieben, mit der Ausnahme durchgeführt, daß 5 µg/ml <sup>125</sup>J-HDL (spez. Akt. 180 cpm/ng) in Gegenwart der angegebenen Mengen nichtmarkierter HDL zur 30minütigen Reaktion eingesetzt wurden.

Angegeben sind die Mittelwerte der spezifischen Bindung ± Standardabweichung.

ZP = Zellprotein

Um die Regulation der Expression von HDL-Rezeptoren in der Makrophagen-Zelllinie PU5-1R zu zeigen, wurde das Sättigungsverhalten der spezifischen Bindung von apoE-armen HDL bei verschiedenen Beladungszuständen der Zellen (Inkubation in Gegenwart unterschiedlicher Mengen acetylierter LDL) untersucht. Abb. 4.48 zeigt eine signifikante Erhöhung der spezifischen Bindung von HDL unter erhöhter Cholesterinbeladung, ähnlich wie es für Peritonealmakrophagen der Maus gezeigt werden konnte (Schmitz, 1985a).

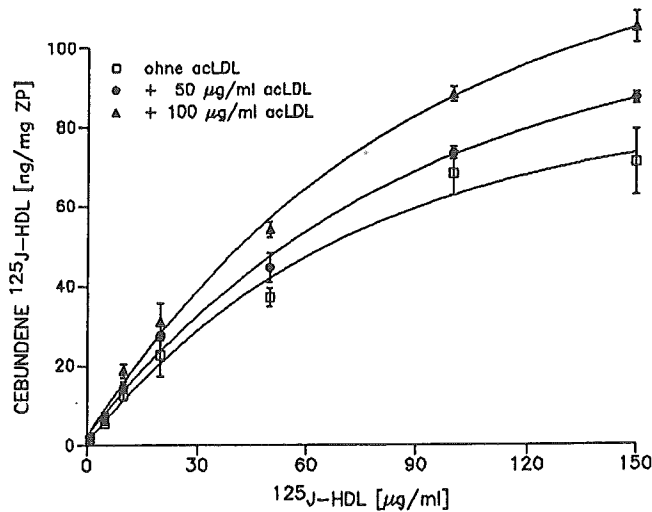


Abb. 4.48: Abhängigkeit der Bindung von  $^{125}\text{J}$ -HDL an PU5-1R-Zellen von der  $^{125}\text{J}$ -HDL-Konzentration. PU5-1R-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an acetylierten LDL in DMEM/ 1 % NEAA/ 0,1 % BSA für 16 h bei 37 °C vorinkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten, wie in der Legende zur Abb. 4.46 beschrieben. Angegeben sind die Mittelwerte der spezifischen Bindung  $\pm$  Standardabweichung.

Eine Auswertung der relevanten Bindungsdaten nach der Scatchard-Methode (Abb. 4.49) zeigt eine streng lineare Beziehung der Gruppendaten, wobei die Parallelität der Linearen auf eine Zunahme der Rezeptordichte bei gleichbleibender Spezifität der Rezeptor-Ligand-Interaktion hinweist. Die ermittelte Dissoziationskonstante  $K_D=0,4 \mu\text{mol/l}$  zeigt eine geringere Spezifität des Rezeptors für die HDL-Fraktion, als es für Maus-Makrophagen gezeigt wurde (Schmitz, 1985a;  $K_D=0,07 \mu\text{mol/l}$ ), was aber auch durch unterschiedliche Präparationen der HDL-Fraktion bzw. unterschiedlichen Lipidstatus der Plasmaspender erklärt werden kann!

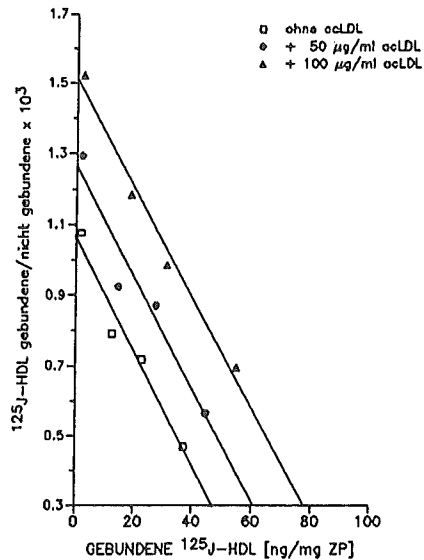


Abb. 4.49: Scatchardanalyse der spezifischen Bindungsdaten aus Abb. 4.48.

Die Regressionsanalyse der spezifischen HDL-Bindungsdaten ergab drei parallele Geraden.

Korrelationskoeffizienten:

$r = 0,981$  (ohne LDL)

$r = 0,967$  (+ 50 µg/ml acLDL)

$r = 0,991$  (+ 100 µg/ml acLDL)

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß die Makrophagen-ähnliche Zelllinie PU5-1R über eine spezifische Bindungsstelle für apoE-armes HDL verfügt, welche über den intrazellulären Cholesteringehalt regulierbar ist. Bei den Untersuchungen mit Referenzsubstanzen (ACAT-Inhibitoren Sandoz 58-035 bzw. Octimibat und Dibutyryl-cAMP) konnte jedoch eine Stimulation der HDL-Rezeptoraktivität nicht reproduzierbar demonstriert werden. Hierfür können vor allem die bereits in Kapitel 4.5 dieses Berichts diskutierten Kultivierungsprobleme bei der PU5-1R-Zelllinie verantwortlich gemacht werden. Der dort beschriebene erfolgreiche Ersatz von Maus-Peritonealmakrophagen durch die permanente Zelllinie ist dadurch erklärbar, daß die Messung der Sekretionsprodukte ein Integral über den Inkubationszeitraum darstellt, kurzzeitige Aktivitätsänderungen der Zellen unter Einfluß z.B. der Proliferationsgeschwindigkeit also nicht signifikant die Meßgröße verändern. Bei den in diesem Kapitel vorgestellten HDL-Bindungsstudien handelt es sich jedoch um eine zeitlich punktuelle Bestimmung; variable Determinanten des sehr schnell regulierten Zellrezeptorstatus

wie Beladungszustand und Proliferationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von Zelldichte und Temperatur müssen zum Bestimmungszeitpunkt optimal aufeinander abgestimmt sein, um eine Vergleichbarkeit von Substanz-/Kontrollgruppe einerseits und von zu verschiedenen Zeiten durchgeführten Untersuchungen andererseits gewährleisten zu können. Mit den methodisch weniger aktiven Peritonealmakrophagen der Maus ist dies nach Standardisierung der Kulturbedingungen und des Versuchsaufbaues möglich, die Proliferations-aktiven makrophagenähnlichen PU5-1R-Zellen hingegen lassen sich nicht für diese Fragestellung verwenden.

Bei den ebenfalls untersuchten Makrophagen-Zelllinien J774 und IC21 konnte unter Beladung mit acetylierten LDL keine signifikante Regulation des HDL-Rezeptors wie bei PU5-1R-Zellen gezeigt werden. Für HDL-Bindungsstudien mit dem zu Beginn dieses Kapitels beschriebenen Ziel sind diese permanenten Zelllinien daher ebenfalls nicht einsetzbar.

#### **4.8 Bestimmung der LDL-Rezeptordichte an HepG2-Zellen**

##### **4.8.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Inkubiert man HepG2-Zellen in Gegenwart von  $^{125}\text{J}$ -LDL, so läßt sich nach Abspülen der nicht gebundenen Radioaktivität das an die Zellmembranen gebundene bzw. aufgenommene LDL mit einem Gamma-Zähler erfassen und liefert damit eine Aussage über die LDL-Rezeptordichte. Der Anteil unspezifischer Bindung wird in Gegenwart eines 100fachen Überschusses an unmarkierten LDL bestimmt. Inkubation dieser Zellen in Gegenwart von Prüfsubstanzen kann zu einer Zunahme der LDL-Rezeptordichte führen, die invers mit der LDL-Konzentration im Plasma korreliert und damit eine Aussage über die potentiell antihyperlipidämischen Eigenschaften der betreffenden Prüfsubstanz erlaubt.

Die bei einem stimulierten "reverse cholesterol transport" vermehrt gebildeten apoE- und Cholesterin-reichen HDL binden mit großer Affinität an den B,E-Rezeptor, so daß durch Hochregulation des hepatischen Rezeptors ein zusätzlicher Benefit für den Cholesterinrücktransport erreicht wird.

##### **4.8.2 Material und Methoden**

###### **4.8.2.1 Zellen**

###### **a) Hepatomazellen**

Es wird eine humane Hepatomazelllinie, literaturbekannt unter der Bezeichnung HepG2, eingesetzt, welche uns 1985 vom Institut für klinische Chemie und Labormedizin der Universität Münster mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Schmitz zur Verfügung gestellt wurde. Die Zellen sind in Kulturmedium unter Zusatz von 10 % DMSO bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit unbekannter Passagenzahl kryokonserviert.

###### **b) Kaninchenaortenzellen**

Für einige Bindungsuntersuchungen wurde eine Kaninchenaorten-Primärkultur eingesetzt. Zur Präparation wird ein ca. 5 cm langes Aortensegment aus dem thorakalen Bereich frisch entnommen und die Blutreste durch intensives Waschen in PBS-Puffer (s. 4.8.2.2) entfernt. Adipöses Gewebe wird mittels sterilem Skalpell entfernt und die Aorta nach

erneutem Waschen in PBS mittels einer heißsterilisierten Schere (2 h, 180 °C) in ca. 5 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und 24 Stunden mit DMEM/10 % FKS/Dispase I (1 U/ml, Boehringer Mannheim, Nr. 210455) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Medium wird anschliessend bei 2.000 Upm abzentrifugiert (Labofuge 6000), das verbleibende Pellet einmal mit DMEM gewaschen und nach Zugabe von DMEM/10 % FKS erneut im Brutschrank 24 h inkubiert. Die nicht von der Dispase abgebauten Gewebsreste werden anschliessend abgesaugt und die adhärennten Kaninchenaortenzellen bis zur Konfluenz kultiviert.

Die Zellen sind seit 1986 in der 5. Passage in Kulturmedium unter Zusatz von 10 % DMSO bei -196 °C kryokonserviert und wurden zwischen der 8. und 15. Passage für die LDL-Bindungsuntersuchungen eingesetzt.

#### **4.8.2.2 Kulturmedium und Puffer**

##### **a) Kulturmedium, Medienadditiva und Antibiotika:**

1. Minimum Essential Medium, nach Dulbecco (DMEM, Boehringer Mannheim Nr. 210048)
2. Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>, Merck Nr. 6323)
3. Streptomycinsulfat (Serva, Nr. 35500)
4. Penicillin G-Kaliumsalz (Serva, Nr. 31749)
5. Fötale Kälberserum (FKS, Seromed, verschiedene Chargen)
6. Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA, 100fach konzentriert, Boehringer Mannheim, Nr. 210293)
7. Rinderserumalbumin (BSA, Sigma A7906)

DMEM Pulverkonzentrat (für 5 l Medium)

- + 18,5 g NaHCO<sub>3</sub>
- + 0,5 g Streptomycinsulfat
- + 0,3 g Penicillin G (500.000 IU)

werden mit bidest. Wasser auf 5 l aufgefüllt und nach 15 - 30minütigem Rühren sterilfiltriert (Filter 0,2 µm, Schleicher & Schüll, Nr. 401352 ).

Die NEAA werden vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Das FKS wird zur Inaktivierung von Proteasen zwei Stunden bei 56 °C hitzeinaktiviert und vor Gebrauch 10 %ig (v/v) dem Flüssigmedium zugesetzt. Dieses hitzeinaktivierte FKS



wird für die Kultivierung der HepG2-Zellen eingesetzt; die Aortenprimärkultur wird mit FKS ohne Inaktivierung beschickt.

BSA wird als sterile 10 %ige Stammlösung in bidest. Wasser bei 4 °C gelagert und dem Flüssigmedium vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Als DMEM-Medium wird grundsätzlich das Nährmedium einschließlich  $\text{NaHCO}_3$ , NEAA und Antibiotika bezeichnet. Alle anderen Zusätze (FKS, BSA, LDL) werden gesondert aufgeführt.

*b) Zusammensetzung des PBS-Puffers*

Zum Waschen der Zellen bei den Bindungsininkubationen wird "phosphate buffered saline " (PBS) verwendet:

8,0 g NaCl (Merck, Nr. 6404)

0,2 g KCl (Merck, Nr. 4936)

1,15g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma, Nr. S0876)

0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Nr. 4873)

werden mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt - der pH-Wert der Lösung betrug 7,0.

*4.8.2.3 Trypsinlösung*

100 ml 0,25 %ige Trypsinlösung (Flow, Nr. 1689454) werden mit 7 ml einer 1 %igen EDTA-Lösung (in sterilem PBS-Puffer) versetzt.

*4.8.2.4 Subkultivierung der HepG2- bzw. Aortenzellen*

Alle im folgenden beschriebenen Arbeitsgänge erfolgen unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank, sterile Verbrauchsware, Pipetten):

1. Medium absaugen
2. 2 ml Trypsinlösung zusetzen (bei NUNC-Petrischalen, d=10 cm, Nr. 150350)
3. Nach 5 min bei 37 °C die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen pipettieren, in dem 2 ml DMEM/10 % FKS vorgelegt werden
4. Zentrifugation bei 2.000 Upm (Labofuge 6000, Heraeus), 1 min
5. Absaugen des Überstandes, Suspendieren des Zellpellets in 5 ml DMEM/10 % FKS

6. Zentrifugation wie 4.
7. Überstand absaugen, Zellpellet in 5 ml DMEM/10 % FKS aufnehmen und auf fünf neue Petrischalen verteilen, in denen 10 ml DMEM/10 % FKS vorgelegt werden.

#### **4.8.2.5 Einfrieren von HepG2 bzw. Aortenzellen**

Punkt 1.-6. wie unter 4.8.2.4 beschrieben

7. Pellet suspendieren in 1 ml DMEM/10 % FKS/10 % DMSO und in eine Ampulle (NUNC, Nr. 363401) pipettieren
8. Mit Einfrierstopfen (Union Carbide) auf Position "G" 2 h im Stickstoffbehälter belassen, danach alle 15 min eine Position tiefer setzen.

#### **4.8.2.6 Präparation von humanen Low-Density-Lipoproteinen (LDL)**

Human-Vollblut der Blutbank Köln (Antikoagulanzen: Citrat) wird in einer Laborzentrifuge (Labofuge 6000, Heraeus) 15 min bei 3.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand (Citrat-Plasma) wird mit Kaliumbromid (KBr, Merck, Nr. 4905) auf eine Dichte von 1,02 g/ml eingestellt und wie folgt zentrifugiert: Ultrazentrifuge L8-70M und 70Ti-Rotor, Quickseal-Röhrchen, Fa. Beckman, 16 h, 65.000 Upm; die Trennung erfolgt bei 4 °C.

Es werden 10 ml Überstand (VLDL, Chylomikronen) mittels Pasteurpipette abgenommen und verworfen.

Die untere Phase wird mit KBr auf eine Dichte von 1,063 g/ml eingestellt und erneut unter oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Die oberen 5-8 ml -je nach LDL-Gehalt des Plasmas - werden mittels Pasteurpipette abgenommen und gegen folgenden Puffer dialysiert:

- 36,0 g Natriumchlorid (NaCl, Merck Nr. 6404)
- 1,5 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Sigma Nr. ED2SS)
- 1,2 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Sigma Nr. S0876)

werden mit vorgekühltem (4 °C) bidest. Wasser auf 4 l aufgefüllt (pH 7,2). Der Dialysepuffer wird jeweils frisch eingesetzt, wobei für 100 ml LDL-Präparation 6mal 4 l Dialysepuffer eingesetzt werden; die Dialyse erfolgt über insgesamt

24 h. Es wird ein Dialyseschlauch mit einer Ausschlußgrenze von 10.000 g/mol (Serva, Nr. 44110) eingesetzt.

Nach einer Proteinbestimmung nach Lowry (s. 4.8.2.7) wird das LDL sterilfiltriert (0,2 µm, Einwegfilterhalter, Sartorius, Nr. 16534K); die maximale Haltbarkeit beträgt 4 Wochen.

#### **4.8.2.7 Proteinbestimmung nach Lowry**

##### **Lösungen:**

- Reagenz A: 2,0 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
0,1 mol/l NaOH
- Reagenz B: 1,0 % Kalium-Natrium-Tartrat  
0,5 % CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
einzeln lösen, dann zusammengeben
- Reagenz C: 50 Teile Reagenz A  
+ 1 Teil Reagenz B

##### **Prüflösung:**

- 100 µl Probe mit 2 ml Reagenz C gut mischen und 10 min stehen lassen.
- 100 µl Folin-Reagenz (Fa. Merck, Nr. 9001) zugeben, gut mischen und 30 min stehen lassen
- 100 µl Triton-X-100 (1%ig in dest. Wasser) zugeben.
- Absorptionsbestimmung gegen Reagenz + Folin + Triton als Leerwert im Spektralphotometer (Beckman, Modell 34) - Wellenlänge: 660 nm

##### **Eichlösung:**

- 0,1 % BSA-Lsg.
- 10-50 µl = 10 - 50 µg BSA/Ansatz

#### **4.8.2.8 Radiojodierung von LDL**

1 ml LDL (Proteingehalt 2-3 mg/ml) werden mit 20 Jodobeads (Pierce Chemical Company, Nr. 28666) und 10 µl (37 MBq) Na<sup>125</sup>J (Du Pont/NEN, Nr. NEZ 033A) 20 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert.

Die mit N-Chloro-Benzolsulfonamid beschichteten Jodobeads dürfen dabei nicht beschädigt werden, da sonst die dadurch bedingte verstärkte oxidative Veränderung der LDL zu einer verminderten LDL-Rezeptor-Affinität führt!

Die LDL werden von den Jodobeads getrennt, 1:1 (v/v) mit eiskalter 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt und sechsmal gegen 1 l dieser Lösung bei 4 °C dialysiert (24 h, Dialyseschlauch mit 10.000er Ausschlußgrenze, Serva, Nr. 44104). Die  $^{125}\text{J}$ -LDL werden nach einer Proteinbestimmung nach Lowry und einer Bestimmung der eingebauten Radioaktivität im Gammacounter (LKB, Rackgamma II, Modell 1270) sterilfiltriert (Einwegfilterhalter, Sartorius, Nr. 16534 K) und bei 4 °C gelagert - die maximale Haltbarkeit beträgt 3 Tage! Die spezifische Aktivität der Präparationen liegt im Bereich 200 - 300 cpm/ng Protein.

#### **4.8.2.9 Durchführung der In-vitro-LDL-Bindungsstudien**

##### **a) Vorbereitung**

Da die LDL-Bindungscharakteristik wesentlich von der Zelldichte im Petrischalensystem abhängig ist, müssen folgende Subkultivierungsmodalitäten unbedingt eingehalten werden:

(1) Die HepG2- bzw. Kaninchenaortenzellen sollten erst ab der 3. (relativ!) Passage nach dem Auftauen einer Ampulle für das LDL-Rezeptorscreening eingesetzt werden, da erst dann ein konfluenter Monolayer Synthese-aktiver Zellen zu realisieren ist.

(2) Die Zellen sollten nicht mehr als 15 Passagen ununterbrochen in Kultur sein, um die Vergleichbarkeit der Screeningergebnisse zu gewährleisten.

##### **b) Durchführung der LDL-Bindungen und Versuchsaufarbeitung**

Die Zellen werden mit Substanzen 24 h bei 37 °C in Multischalen inkubiert, einmal mit eiskaltem PBS/0,1 % BSA-Puffer gewaschen und im Eisbad mit 0,25 ml eisgekühltem DMEM/10 µg/ml  $^{125}\text{J}$ -LDL für 30 min inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung werden Kontrollinkubationen in Gegenwart von 1 mg/ml nicht-markierter LDL durchgeführt. Der Monolayer wird anschliessend zweimal mit PBS/ 0,1 % BSA-Puffer und fünfmal mit PBS-Puffer ohne Zusatz gewaschen. Beide Puffer sind eisgekühlt, um eine vermehrte Degradation der gebundenen LDL zu verhindern.

Die Zellen werden durch Zugabe von 500 µl 0,5 mol/l NaOH-Lösung/MS-Vertiefung solubilisiert und die gebundene LDL-Radioaktivität im Gammacounter (LKB, Rackgamma II Modell 1270) quantifiziert. Ein 100 µl-Aliquot wird zur Zellproteinbestimmung nach Lowry eingesetzt.

#### **4.8.2.10 Durchführung der Ex-vivo-LDL-Bindungsstudien**

Die in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefrorene und gelagerte Kaninchenleber wird in PBS-Puffer aufgetaut, gewaschen und sofort mittels eines Potter-Homogenisators (B. Braun, Typ 853202) 10 %ig in PBS-Puffer unter Eiskühlung homogenisiert. Das Leberhomogenat wird 15 sec bei 40 W ultrabeschallt (Branson Sonifier, Typ B12) und eine Lowry-Proteinbestimmung nach 1:10-Verdünnung (mit PBS) von einem 20 µl-Aliquot durchgeführt.

Die Bindungsuntersuchungen werden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nr. 72693) durchgeführt, welche 24 h bei 37 °C mit PBS/0,1% BSA vorinkubiert sind.

Zur LDL-Bindung werden 300 µg Leberhomogenatprotein (ca. 200-300 µl, je nach Proteingehalt des Homogenates) mit eiskaltem PBS-Puffer auf 500 µl aufgefüllt und mit 0,5 ml Bindungspuffer (PBS/0,1 % BSA/1 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ ), welcher 10 µg/ml  $^{125}\text{J}$ -LDL enthält, versetzt und 1 h im Eisbad inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung werden pro Behandlungsgruppe drei Inkubationsansätze in Gegenwart von 1 mg/ml nichtmarkierter LDL durchgeführt.

Das Homogenat wird pelletiert (Beckman, Microfuge 12, 10.000 x g), zweimal mit PBS/0,1 % BSA und 2mal mit PBS ohne BSA gewaschen (= suspendieren in 0,5 ml Waschpuffer, pelletieren mittels Zentrifugation) und die gebundene Radioaktivität im Gammacounter (LKB, Rackgamma II Modell 1270) quantifiziert.

#### **4.8.2.11 Auswertung der Bindungsstudien**

Bestimmt wird die spezifisch gebundene Masse der  $^{125}\text{J}$ -LDL durch Subtraktion der in Gegenwart eines 100fachen Überschusses von LDL gebundenen Radioligandenmenge von der Gesamtbindungs- menge bei den Kontroll- bzw. Substanzinkubationen. Die

Radioaktivitätsdaten werden dabei immer auf das Zell- bzw. Homogenatprotein bezogen, wobei aus drei Inkubationsansätzen pro Substanz bzw. Konzentration der Mittelwert ermittelt wird. Die substanzbedingte Beeinflussung der LDL-Rezeptoraktivität wird als Differenz zur Kontrollinkubation prozentual ausgedrückt. Die Auswertung der In-vitro-Untersuchungen erfolgt durch ein für diese Zwecke entwickeltes Computerprogramm (Programmiersprache: BASIC).

#### **4.8.3 Ergebnisse und Diskussion**

Die Inkubation von HepG2-Zellen in Gegenwart von  $^{125}\text{J}$ -LDL führt zu einer zeitabhängigen Zunahme der Bindung bis zu etwa 30 min, während dann die Bindung konstant bleibt (Abb. 4.50). Eine Sättigung des LDL-Rezeptors wird bei ca. 40  $\mu\text{g/ml}$   $^{125}\text{J}$ -LDL erreicht (Abb. 4.51).

Zur Charakterisierung der LDL-Bindung an Zellen der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 wurde die  $^{125}\text{J}$ -LDL-Bindung nach der Scatchard-Methode ausgewertet (Abb. 4.52). Es ergab sich eine Bindungskonstante ( $K_D$ ) von 100 nmol/l für die spezifisch gebundenen LDL bei ca. 200.000 Rezeptoren/Zelle - Daten, die in guter Übereinstimmung mit der Literatur stehen (u.a. Havekes, et al., 1983).

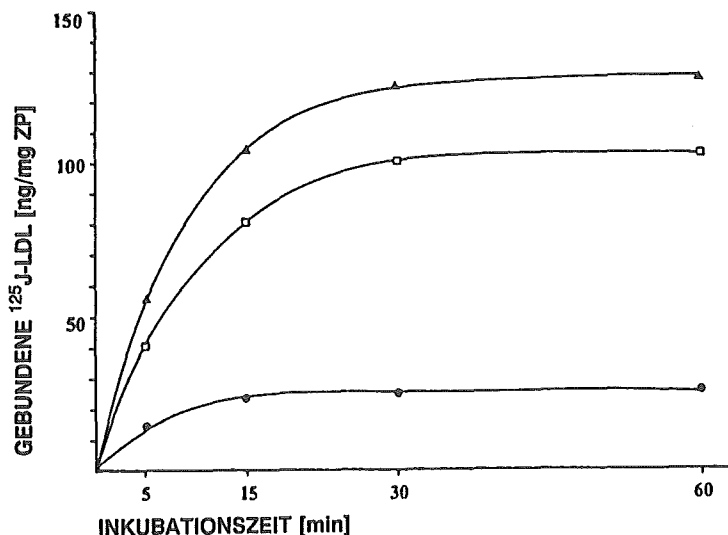


Abb. 4.50: Abhängigkeit der Bindung von  $^{125}\text{J}$ -LDL an HepG2-Zellen von der Reaktionszeit. HepG2-Zellen wurden für 4 h bei 37 °C in DMEM/ 1 % NEAA (Boehringer Mannheim)/ 0,1 % BSA vorinkubiert. Nach Zusatz von eiskaltem Medium, welches zusätzlich 30  $\mu\text{g/ml}$   $^{125}\text{J}$ -LDL (spez. Akt. 210 cpm/mg Protein) enthielt, wurde für die angegebenen Zeiten bei 4 °C (Eisbad) inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden Kontrollinkubationen in Gegenwart von 1,5 mg/ml nichtmarkierter LDL durchgeführt. Die Zellen wurden anschliessend zweimal mit PBS-Puffer/0,1 % BSA und fünfmal mit PBS ohne BSA gewaschen und mit 0,5 mol/l NaOH solubilisiert. Die Zell-assoziierte Radioaktivität wurde im Gammazähler (LKB, Modell 1270) quantifiziert; ein 100  $\mu\text{l}$ -Aliquot diente der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951). Die angegebenen Daten sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen.

- ▲ Gesamthbindung
- spezifische Bindung
- unspezifische Bindung

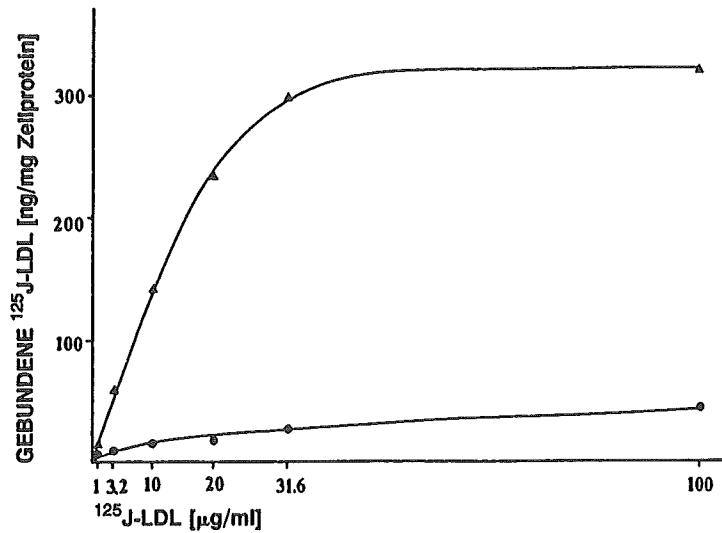


Abb. 4.51: Abhängigkeit der Bindung von  $^{125}\text{J-LDL}$  an HepG2-Zellen von der  $^{125}\text{J}$ -Konzentration. Die Bindungsstudien wurden für 1 h mit den angegebenen Konzentrationen an  $^{125}\text{J-LDL}$  durchgeführt. Weitere experimentelle Details sind in der Legende zu Abb. 4.50 beschrieben. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei Bestimmungen.

- ▲ spezifische Bindung
- unspezifische Bindung



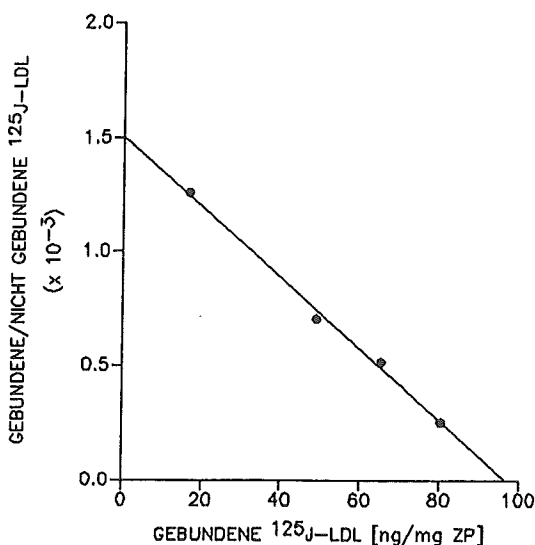


Abb. 4.52: Scatchard-Analyse der konzentrationsabhängigen Bindung von  $^{125}\text{J}$ -LDL an HepG2-Zellen.

HepG2-Zellen wurden für 4 h bei 37 °C in DMEM/ 1 % NEAA (Boehringer Mannheim)/ 0,1 % BSA vorinkubiert. Nach Zusatz von eiskaltem Medium, welches zusätzlich 10 µg/ml  $^{125}\text{J}$ -LDL (spez. Akt. 265 cpm/mg Protein) enthielt, wurde für 30 Min. bei 4 °C (Eisbad) inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden Kontrollinkubationen in Gegenwart von 1,0 mg/ml nichtmarkierter LDL durchgeführt. Die Zellen wurden anschliessend zweimal mit PBS-Puffer/ 0,1 % BSA und fünfmal mit PBS ohne BSA gewaschen und mit 0,5 mol/l NaOH solubilisiert. Die Zell-assoziierte Radioaktivität wurde im Gammazähler (LKB, Modell 1270) quantifiziert; ein 100 µl-Aliquot diente der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951).

Angegebenen sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen. Eine Regressionsanalyse verdeutlichte den linearen Zusammenhang der Scatchard-Daten mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,998$ .  
ZP = Zellprotein

Um eine Gewebsspezifität der Substanzen bei der LDL-Rezeptorregulation zu erkennen, wurde ein zum HepG2-Modell analoges Modell mit Aortenzellen etabliert. Da in der Lipidforschung bevorzugt Kaninchen eingesetzt werden, wurde - trotz fehlender Vergleichsdaten aus der Literatur - eine bei uns angelegte Kaninchen-Zelllinie eingesetzt.

Die Inkubation der Aortenzellen in Gegenwart von  $^{125}\text{J}$ -LDL führt zu einer zeitabhängigen Zunahme der Bindung (Abb. 4.53).

Die Abhängigkeit der  $^{125}\text{J}$ -LDL-Bindung von der LDL-Konzentration zeigt eine Sättigung der spezifischen Bindung (Abb. 4.54) und liefert nach der Auswertung mittels Scatchard-Methode (Abb. 4.55) eine Bindungskonstante ( $K_D$ ) von 10 nmol/l bei ca. 80.000 Rezeptoren/Zelle.

Untersuchungen mit an HepG2-Zellen wirksamen Prüfsubstanzen zeigten, daß eine Beeinflussung der Rezeptoraktivität bei den eingesetzten Aortenzellen wesentlich weniger ausgeprägt verläuft. Es wurden nur Änderungen der Bindungsrate von ca. 10-15 % gemessen, was eine Aussage über die Substanzwirkung auf die Rezeptoraktivität nicht zuläßt. Für die meisten der bei Hepatomazellen stimulierend wirkenden Substanzen konnte jedoch tendenziell eine Senkung der LDL-Rezeptoraktivität beobachtet werden.

Wegen der begrenzten Aussagekraft wurden die Aortenzellen nicht weiter für ein Substanzscreening eingesetzt.

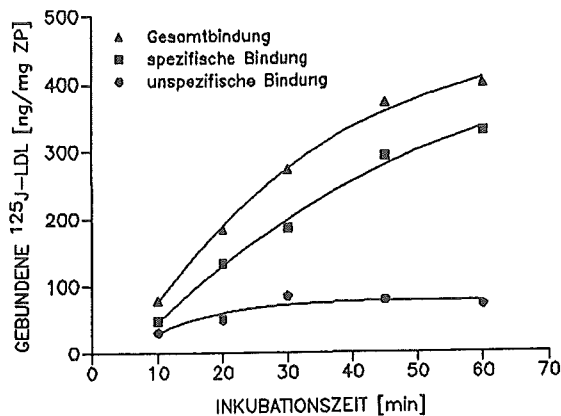


Abb. 4.53: Abhängigkeit der Bindung von  $^{125}\text{J}$ -LDL an Kaninchenaortenzellen von der Inkubationszeit. Kaninchenaortenzellen wurden für 4 h bei 37 °C in DMEM/ 1 % NEAA (Boehringer Mannheim)/ 0,1 % BSA vorinkubiert. Nach Zusatz von eiskaltem Medium, welches zusätzlich 10 µg/ml  $^{125}\text{J}$ -LDL (spez. Akt. 275 cpm/mg Protein) enthielt, wurde für die angegebenen Zeiten bei 4 °C (Eisbad) inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden Kontrollinkubationen in Gegenwart von 1,0 mg/ml nicht-markierter LDL durchgeführt. Die Zellen wurden anschliessend zweimal mit PBS-Puffer/0,1 % BSA und fünfmal mit PBS ohne BSA gewaschen und mit 0,5 mol/l NaOH solubilisiert. Die Zell-assoziierte Radioaktivität wurde im Gammazähler (LKB, Modell 1270) quantifiziert; ein 100 µl-Aliquot diente der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951). Angegeben sind die Mittelwerte aus 3 Bestimmungen. ZP = Zellprotein

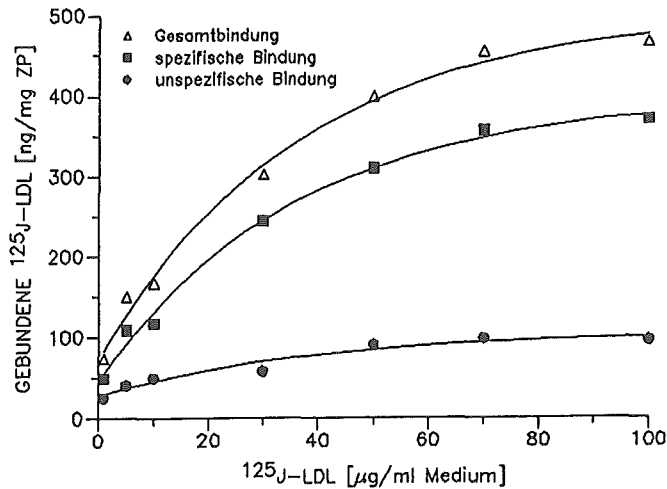


Abb. 4.54: Abhängigkeit der Bindung von  $^{125}\text{J}$ -LDL an Kaninchenaortenzellen von der  $^{125}\text{J}$ -LDL-Konzentration. Die Bindungen wurde für 30 min mit den angegebenen Konzentrationen von  $^{125}\text{J}$ -LDL durchgeführt. Weitere experimentelle Details sind in der Legende zu Abb. 4.53 beschrieben. Angegeben sind die Mittelwerte aus 3 Bestimmungen.

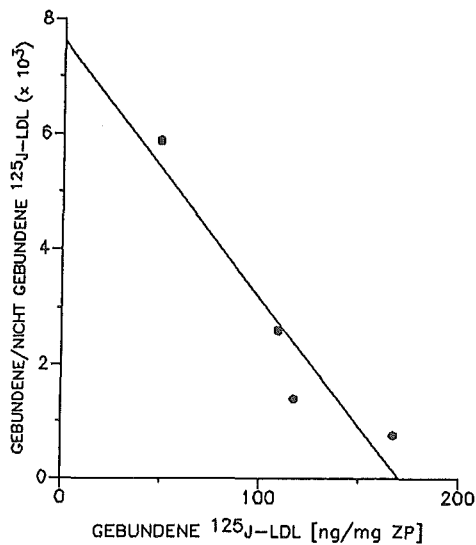


Abb. 4.55: Scatchard-Analyse der Daten aus Abb. 4.54. Die Regressionsanalyse ergab eine Gerade mit  $r = 0,949$ .

Im Kapitel 4.4 wurde auf die Möglichkeit der Cholesterinbeladung von HepG2-Zellen mittels kationisierter LDL hingewiesen. Da eine "Down"-Regulation des hepatischen LDL-Rezeptors unter Cholesterin-reicher Diät in vivo bereits aus der Literatur bekannt ist (Kovanen et al., 1981), wurde der Einfluß der Cholesterinbeladung von HepG2-Zellen auf deren LDL-Bindung untersucht. Die gewonnenen "In-vitro"-Daten (Abb. 4.56) bestätigen die "In-vivo"-Befunde, d.h. die LDL-Bindung wird mit steigender Cholesterinbeladung der Zellen stark reduziert.

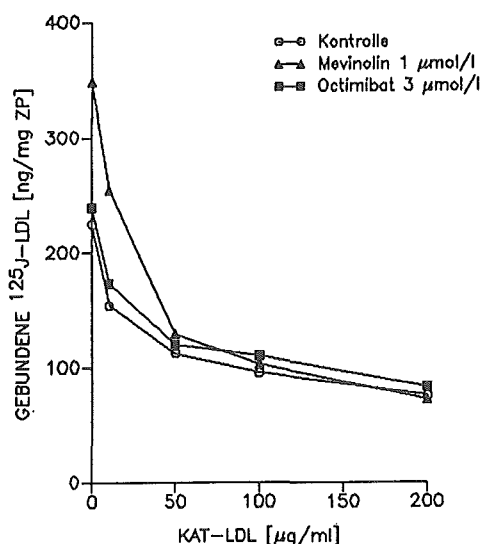


Abb. 4.56: Einfluß des zellulären Cholesteringehaltes auf die spezifische LDL-Bindung an HepG2 Zellen in Abwesenheit und in Anwesenheit des ACAT-Inhibitors Octimibat und des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Mevinolin. HepG2-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen kationisierter LDL für 24 h bei 37 ° im Brutschrank inkubiert und so mit Cholesterin beladen. Die weiteren Arbeitsschritte wurden, wie im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben, durchgeführt.

Außerdem lassen sich weitergehende mechanistische Schlüsse ableiten. So führt die als selektiver HMG-CoA-Reduktase-Inhi-

bitor bekannte Substanz Mevinolin bei der unbeladenen Zelle im Vergleich zur Kontrolle zu einer deutlichen Erhöhung der LDL-Bindung, welche bei Beladung mit Cholesterin mit steigendem Beladungsgrad und damit zunehmender Suppression der intrazellulären Cholesterinbiosynthese bis auf den Kontrolllevel abnimmt. Der Effekt von Octimibat, das nur moderat die LDL-Bindung erhöht, ist hingegen unabhängig von der Cholesterinbiosyntheserate.

Zur Korrelation der mit HepG2-Zellen gewonnenen LDL-Bindungsdaten mit In-vivo-Ergebnissen wurde die  $^{125}\text{J}$ -LDL-Bindung an Kaninchenleber-Homogenaten nach Diätfütterung der Tiere mit bzw. ohne Substanzbehandlung untersucht. Abbildung 4.57 zeigt die "Down"-Regulation des hepatischen LDL-Rezeptors unter 0,1 %iger Cholesterindiät und die moderate Zunahme der  $^{125}\text{J}$ -LDL-Bindung unter 30 mg/kg Octimibat (im Vergleich zur Kontrolle), die unabhängig vom Lipidstatus der Leber ist. Abbildung 4.58 verdeutlicht den Einfluß der Substanzen NAT 04-473 und NAT 04-477 auf die LDL-Bindung am Leberhomogenat normolipidämischer Kaninchen. Der fehlende Einfluß von NAT 04-473 auf die Rezeptorbindung bzw. die deutliche "Down"-Regulation des LDL-Rezeptors unter NAT 04-477-Therapie wurde bereits vorher "in vitro" an unbeladenen HepG2-Zellen festgestellt (Tab. 4.16). Bei der Prüfung dieser beiden Substanzen in einem weiteren Tiermodell wurde unter Beladung mit NAT 04-477 eine Erhöhung des LDL-Cholesterins im Vergleich zur Kontrolle festgestellt, während NAT 04-473 eine Senkung dieses Plasmaparameters bewirkte.

Ein Vergleich der in vitro an der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 erhobenen Daten mit den Ex-vivo- $^{125}\text{J}$ -LDL-Bindungsdaten an Leberhomogenat behandelte Kaninchen zeigt tendenziell eine gute Übereinstimmung der beiden Parameter, wobei eine statistische Auswertung einen signifikanten Zusammenhang aufweist (Korrelationskoeffizient  $r = 0,776$ ;  $p < 0,05$ ) (Tab. 4.17).

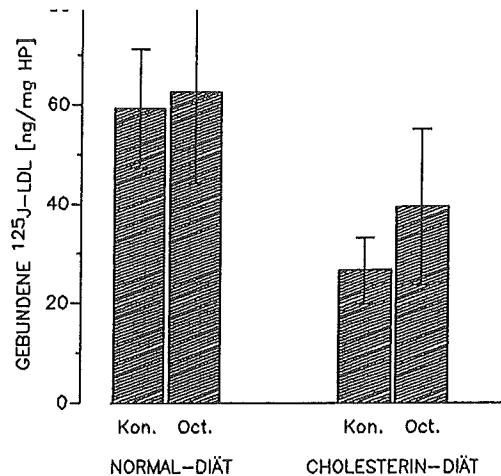


Abb. 4.57: Bestimmung der hepatischen LDL-Bindung ex vivo. 24 männliche Weiße Neuseeländer-Kaninchen erhielten eine Woche eine 1 %ige Cholesterindiät. Anschließend erhielten 12 randomisiert ausgewählte Tiere 17 Tage eine Normaldiät. 6 Tiere erhielten dann für 14 Tage 30 mg/kg Octimibat p.o., während die restlichen 6 Tiere als Kontrollgruppe dienten. Die zweite 12er Gruppe wurde in der gleichen Weise behandelt, jedoch wurde hier im Anschluß an die 1 %ige Cholesterindiät auf eine 0,1 %ige umgestellt (= Cholesterindiät). 1 g der Kaninchenlebern wurde dann mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisierer in 9 ml eiskaltem PBS-Puffer (pH 7,4) suspendiert und eine Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) durchgeführt. 300 µg Homogenatprotein wurden in Gegenwart von 10 µg/ml  $^{125}\text{J}$ -LDL (spez. Akt. 290 cpm/ng Protein) 1 h bei 4 °C in Eppendorf-Reaktionsgefäßen inkubiert. Die Ansätze wurden danach in einer Beckman-Mikrofuge B für 5 min zentrifugiert (ca. 10.000 x g), zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer/ 0,1 % BSA und zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer ohne BSA gewaschen. Die Radioaktivität wurde in einem Gammazähler (LKB, Modell 1270) quantifiziert. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte von 6 Tieren und 3 Bestimmungen pro Tier.

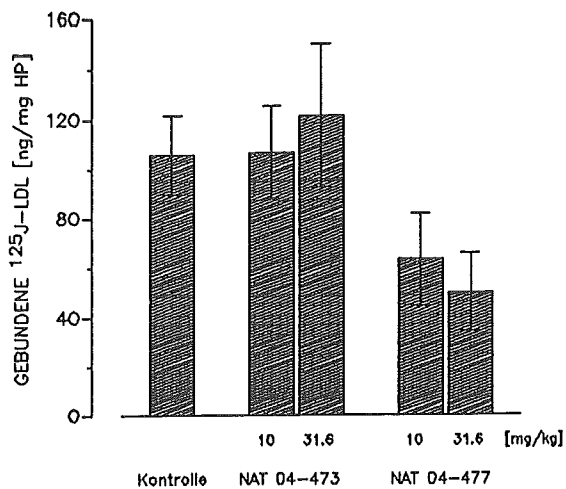


Abb. 4.58: Bestimmung der hepatischen LDL-Bindung ex vivo. 30 Weiße Neuseeländer-Kaninchen wurden für eine Woche mit einer 1 %igen Cholesterindiät und anschließend 17 Tage mit einer Normaldiät gefüttert. 6er-Gruppen wurden randomisiert und wie angegeben mit NAT 04-473 bzw. NAT 04-477 für 3 Tage behandelt (p.o.-Applikation, Dosisangaben in mg/kg). Weitere experimentelle Details sind in der Legende zu Abb. 4.57 beschrieben.



Tab. 4.16: Einfluß einiger repräsentativer Substanzen auf die <sup>125</sup>J-LDL-Bindung an HepG2-Zellen.

HepG2-Zellen wurden mit 1 bzw. 10 µmol/l der angegebenen Substanzen 24 h in serumfreiem DMEM/ 1 % NEAA inkubiert. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne Substanz. Weitere experimentelle Details sind im Kapitel "Material und Methoden" angegeben.

Substanz	Konzentration [µmol/l]	LDL-Bindung [% der Kontrolle]
NAT 04-544	1	60
	10	43
NAT 04-538	1	90
	10	66
NAT 04-555	1	107
	10	118
NAT 04-473	1	108
	10	117
NAT 04-477	1	49
	10	70
NAT 06-209	1	116
	10	140
NAT 06-210	1	122
	10	141
Progesteron	1	83
	10	69

Tab. 4.17:  $^{125}\text{J}$ -LDL-Bindung in vitro und ex vivo.

(A) Einfluß von Substanzen auf die  $^{125}\text{J}$ -LDL-Bindung an HepG2 Zellen.

HepG2-Zellen wurden mit 1  $\mu\text{mol/l}$  der angegebenen Substanzen 24 h in serumfreiem DMEM/ 1 % NEAA inkubiert. Als Kontrolle (n=6) dienten Ansätze ohne Substanz. Weitere experimentelle Details sind im Kapitel "Material und Methoden" angegeben. In der Tabelle ist die prozentuale Steigung bzw. Abnahme der Bindung in Gegenwart der Prüfsubstanzen (n=3) dargestellt.

(B) Bestimmung der hepatischen LDL-Bindung ex vivo.

12 männliche Weiße Neuseeländer Kaninchen erhielten eine Woche eine 1 %ige Cholesterindiät. Anschließend erhielten die Tiere eine Normaldiät. 6 Tiere wurden dann 3 Tage mit 31,6 mg/kg der angegebenen Substanzen p.o. behandelt, während die restlichen 6 Tiere als Kontrollgruppe dienten.

1 g der Kaninchenlebern wurde dann mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisierer in 9 ml eiskaltem PBS-Puffer (pH 7,4) suspendiert und eine Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) durchgeführt.

300  $\mu\text{g}$  Homogenatprotein wurden in Gegenwart von 10  $\mu\text{g/ml}$   $^{125}\text{J}$ -LDL (spez. Akt. ca. 250 cpm/ng Protein) 1 h bei 4 °C in Eppendorf-Reaktionsgefäßen inkubiert. Die Ansätze wurden danach in einer Beckman-Mikrofuge 12 für 5 min zentrifugiert (ca. 10.000 x g), zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer/ 0,1 % BSA und zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer ohne BSA gewaschen. Die Radioaktivität wurde in einem Gamma-zähler (LKB, Modell 1270) quantifiziert.

Angegebene Daten sind Mittelwerte von 6 Tieren und 3 Bestimmungen pro Tier.

Substanzen	in vitro [%]	ex vivo [%]
NAT 04-533	+ 2	+ 17
NAT 04-473	+ 8	+ 10
NAT 04-477	- 51	- 53
NAT 04-555	+ 7	+ 61
NAT 04-557	+ 14	+ 112
NAT 04-558	- 28	- 38
NAT 04-363	- 7	- 3
NAT 04-611	- 18	- 21
NAT 33-011	+ 16	+ 8

Mit dem beschriebenen In-vitro-Modell besteht also große Aussicht, ein effizientes Lipidsenker- bzw. Lipidmodulator-Screening mit stark reduziertem Tierversbrauch durchführen zu können.

Um Aussagen über den Mechanismus machen zu können, der einer erhöhten LDL-Bindung zugrunde liegt, wurde der Einfluß einer ausgewählten Substanz (Octimibat) auf das Sättigungsverhalten der Rezeptor-Ligand-Interaktion bei verschiedenen Substanzkonzentrationen untersucht (Abb. 4.59). Theoretische Erwägungen lassen an eine stimulierte Bindung des Liganden infolge gesteigerter Affinität des Rezeptors für den Liganden und/oder eine Erhöhung des Rezeptordichte auf der Zellmembran denken. Zur Prüfung, welcher Mechanismus im Fall des Octimibats vorliegt, wurden die Sättigungsbindungsdaten nach der Scatchard-Methode ausgewertet (Abb. 4.60). Die gleichbleibende Steigung der 3 Sättigungslinearen indiziert eine konstante Bindungsaffinität unter Einfluß der Substanz, wobei die Zunahme der spezifisch gebundenen  $^{125}\text{J}$ -LDL (Abzissenabschnitt) als eine Erhöhung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche gewertet werden muß.

Ob diese erhöhte Rezeptorzahl bedingt ist durch eine vermehrte Neusynthese von Rezeptoren oder durch eine längere Verweildauer des Rezeptor auf der Zelloberfläche, können molekularbiologische Untersuchungen (Kapitel 4.9) klären.

RP 63743, eine Prüfsubstanz, welche im Screening auf LDL-Rezeptoraktivität positiv auffiel, beeinflusst hingegen ausschließlich die Affinität des LDL-Rezeptors zum Liganden (Abb. 4.61); molekularbiologische Untersuchungen zeigten bestätigend keine erhöhte Expression des LDL-Rezeptorgens.

Mit den vorgestellten Modellen in Kombination mit molekularbiologischen Untersuchungen (Kap. 4.9) läßt sich sehr effizient ein Screening auf Lipidsenker mit stimulierendem Einfluß auf den LDL-Rezeptor *ohne* Tierversuch durchführen. Pharmakokinetische Parameter (First-Pass-Effekt) sowie Absorption der Wirkstoffe im Darm sind die ersten Bestimmungen, die nach sehr genauer Untersuchung des Wirkmechanismus am Tier durchgeführt werden müssen. Weit über 95 % der Tiere können bei diesem Approach eingespart werden.

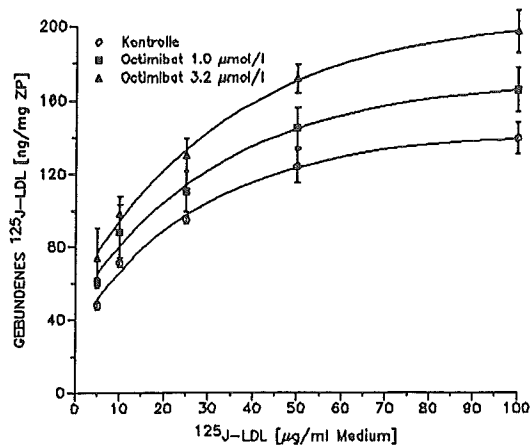


Abb. 4.59: Einfluß von Octimibat auf die konzentrationsabhängige Bindung von  $^{125}\text{J}$ -LDL an HepG2 Zellen. Die Bindungen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an  $^{125}\text{J}$ -LDL (spez. Akt. 230 cpm/ng) und Substanzen durchgeführt. Weitere experimentelle Details sind im Kapitel "Material und Methoden" angegeben. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

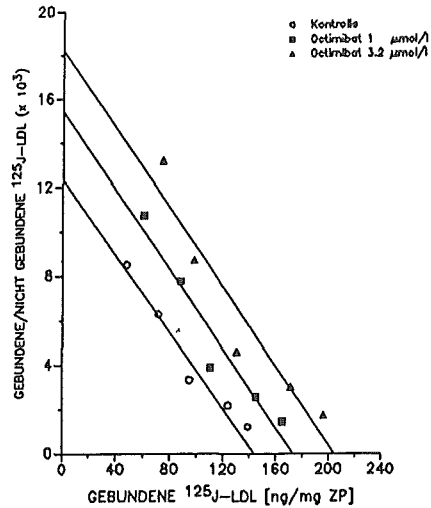


Abb. 4.60: Scatchard-Analyse der Bindungsdaten aus Abb. 4.59.  
Die Regressionsanalyse ergab drei parallele Geraden  
mit folgenden Korrelationskoeffizienten:  
 $r = 0,98$  (Kontrolle),  
 $r = 0,97$  ( $1 \mu\text{mol/l}$  Octimibat),  
 $r = 0,95$  ( $3 \mu\text{mol/l}$  Octimibat).

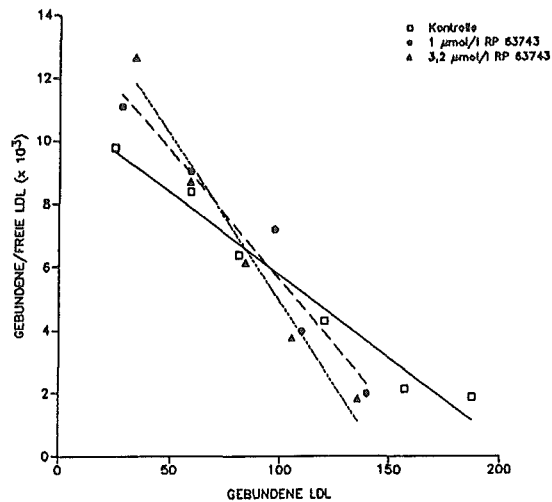


Abb. 4.61: Scatchard-Analyse der spezifischen LDL-Bindungs-  
daten in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von RP 63743.  
Die experimentellen Details sind im Kapitel  
"Material und Methoden" aufgeführt.

## **4.9 Bestimmung der LDL-Rezeptor-Genexpression in HepG2-Zellen**

### **4.9.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

In diesem Modell wird der Einfluß von Testsubstanzen auf den LDL-Rezeptor-mRNA-Spiegel in HepG2-Zellen gemessen. Hierzu wird die Gesamt-RNA von mit Substanz-inkubierten HepG2-Zellen präpariert und die spezifische mRNA nach Bindung an Nitrocellulose mit einer radioaktiven Hybridisierungsprobe detektiert. Die Auswertung erfolgt autoradiographisch im Vergleich zu einer ebenfalls gemessenen Standard-mRNA ( $\beta$ -Tubulin). Diese Untersuchung ist als Folgemodell zur LDL-Bindung an HepG2-Zellen gedacht und gibt Auskunft, ob eine erhöhte LDL-Bindung durch einen Anstieg des mRNA-Spiegels bedingt ist. Das Modell erlaubt daher, eine weitergehende Aussage über den Wirkmechanismus einer Substanz zu machen, der zu einer erhöhten Bindung von LDL an die untersuchten Zellen führt. Ob dem Anstieg des mRNA-Spiegels eine Genaktivierung zu Grunde liegt, soll in einem "Run-off"-Transkriptionsmodell nachgewiesen werden, das z.Z. etabliert wird.

### **4.9.2 Material und Methoden**

#### **4.9.2.1 Prüfsubstanzen**

Die zu testenden Substanzen werden in Ethanol in einer Konzentration von 1 mmol/l gelöst. Dies entspricht der 100fachen Endkonzentration von 10  $\mu$ mol/l.

#### **4.9.2.2 Zellkultur**

##### **4.9.2.2.1 Zellen**

Die verwendete HepG2-Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC Nr. HB 8065) bezogen. Sie wurde aus einem Humanleberkarzinom gewonnen und besitzt noch einige für Leberzellen typische Eigenschaften (Knowles et al., 1980).

#### 4.9.2.2.2 Kulturmedien und Puffer

##### a) Kulturmedium, Medienadditiva und Antibiotika:

1. Minimum Essential Medium, nach Dulbecco (DMEM, Boehringer Mannheim Nr. 210048)
2. Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ , Merck Nr. 6323)
3. Streptomycinsulfat (Serva, Nr. 35500)
4. Penicillin G-Kaliumsalz (Serva, Nr. 31749)
5. Fötale Kälberserum (FKS, Seromed, verschiedene Chargen)
6. Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA, 100fach konzentriert, Boehringer Mannheim, Nr. 210293)
7. Ultrosor (BRL 091-25950H)

DMEM Pulverkonzentrat (für 5 l Medium)

- + 18,5 g  $\text{NaHCO}_3$
- + 0,5 g Streptomycinsulfat
- + 0,3 g Penicillin G (500.000 IU)

werden mit bidest. Wasser auf 5 l aufgefüllt und nach 15-30minütigem Rühren sterilfiltriert (Filter 0,2  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schüll, Nr. 401352).

Die NEAA werden vor Gebrauch 1fach konzentriert zugesetzt.

Das FKS wird zur Inaktivierung der Proteasen 2 h auf 56 °C (Wasserbad) erhitzt und vor Gebrauch 10 %ig (v/v) dem Flüssigmedium zugesetzt.

Als DMEM-Medium wird grundsätzlich das Nährmedium einschließlich  $\text{NaHCO}_3$ , NEAA und Antibiotika bezeichnet. Alle anderen Zusätze werden gesondert aufgeführt.

##### b) Zusammensetzung des PBS-Puffers

Zum Waschen der Zellen wird "phosphate buffered saline" (PBS) verwendet:

- 8,0 g NaCl (Merck, Nr. 6404)
- 0,2 g KCl (Merck, Nr. 4936)
- 1,15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma, Nr. S0876)
- 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Nr. 4873)

werden mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt; der pH-Wert der Lösung beträgt 7,0.

#### 4.9.2.2.3 Trypsinlösung

100 ml 0,25 %ige Trypsinlösung (Flow, Nr. 1689454) werden mit 7 ml einer 1 %igen EDTA-Lösung (in sterilem PBS-Puffer) versetzt.

#### 4.9.2.2.4 Anzucht und Vorbereitung der HepG2-Zellen

Die Passagierung der Zellen erfolgt auf 10 cm-Schalen (Nunc), in dem jeweils freitags die Zellen einer Schale (ca. 80 % konfluent) auf 4 neue Schalen verteilt werden. Hierzu wird das Medium (DMEM + 1 x NEAA + 10 % FKS) abgesaugt, und die Zellen werden mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Trypsinlösung wird 3-5 min im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen abgelöst haben, sollte das Trypsin sofort durch Zugabe von 10 ml Medium mit FKS inhibiert werden. Die Zellen werden dann abzentrifugiert, in 40 ml Medium mit FKS resuspendiert und auf 4 Schalen verteilt. Diese Zellen können dann eine Woche, bis zur nächsten Passage, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert werden.

Für Substanzversuche werden die Zellen einer Schale auf 10 6 cm-Schalen (Nunc) nach der gleichen Vorgehensweise verteilt und bis Montag unter den üblichen Bedingungen inkubiert. Montags wird das Medium mit FKS gegen DMEM + 1 x NEAA ausgetauscht und über Nacht weiterinkubiert. Am nächsten Morgen erfolgt die Zugabe der in Ethanol gelösten Substanzen zum Inkubationsmedium (gut mischen !). Die Kontroll-Schalen werden mit der entsprechenden Menge Ethanol versetzt. Die Inkubation mit Substanzen erfolgt für die gewünschte Zeit (24 h) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

#### 4.9.2.3 Reagenzien

Guanidiniumthiocyanat	Sigma G 6639
N-Laurylsarcosine Na-Salz	Sigma L 5125
DL-Dithiothreitol	Sigma D 0632
Phenol	BRL 5509 UA
Diethylpyrocarbonat	Sigma D 5758
Adenosin-5'-triphosphat	Sigma A 6144
Guanosin-5'-triphosphat	Boehringer MA 106399
Uridin-5'-triphosphat	Boehringer MA 110213



[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-Cytidin-5'-triphosphat (29,6 TBq/mmol)	NEN NEG-008X
RNA-Polymerase, SP6 (EC 2.7.7.6)	Boehringer MA 810266
RNA-Polymerase, T7 (EC 2.7.7.6)	Boehringer MA 881767
RNase-Inhibitor	Boehringer MA 799017
DNase I (RNase-frei; EC 3.1.21.1)	Boehringer MA 776785
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva 11920
Trichloressigsäure	Merck 807
Natriumchlorid	Merck 6404
tri-Natriumcitrat	Merck 6447
Formaldehyd-Lösung	Merck 4001
Ammoniumacetat	Merck 1116
Formamid	Merck 4008
Natriumdihydrogenphosphat	Merck 6346
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck 6580
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Fluka 71729
Ficoll	Sigma F 2637
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Sigma P 5288
Heringsspermien-DNA	Sigma D 9156
Röntgenfilm (X-Omat AR 24x30 cm)	Kodak 1501451
Röntgenfilmentwickler DEN 19	Kodak 5027065
Röntgenfilmfixierer Unifix	Kodak 5011036
Trizma Base	Sigma T 1503
Salzsäure	
Magnesiumchlorid	Merck 5833
Chloroform	Riedel-de-Haen J2211
Isoamylalkohol	Merck 976
Sucrose	Sigma 59378
BamHI-Restriktionsendonuklease	Boehringer MA 220612
PvuII-Restriktionsendonuklease	Boehringer MA 642690
Ampicillin	Boehringer MA 835242
EDTA	Merck 8418
Paraffinöl	Merck 7162
Isopropanol	Riedel-de-Haen 33539
Butanol	Merck 1990
Caesiumchlorid	Gibco BRL 540-5507
Lysozym	Sigma L-6876
Triton X-100	Merck 11869
Ethidiumbromid	Fluka 46065
Ethanol	Merck 983
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck 4873

di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck 5099
Trypton	Difco 0123-01
Hefextrakt	Difco 0127-01
Glycerin	Merck 4091

#### 4.9.2.4 RNA-Präparation aus kultivierten Zellen

##### *Puffer und Lösungen*

- Guanidiniumthiocyanat-Lösung
  - 4 mol/l Guanidiniumthiocyanat
  - 25 mmol/l Natriumcitrat (pH 7,0)
  - 0,5 % N-Laurylsarcosin, Na-Salz
  - 0,1 mol/l Dithiothreitol
- 2 mol/l Natriumacetat, pH 4,0
- bidest. Wasser, behandelt mit Diethylpyrocarbonat
- Phenol (H<sub>2</sub>O-gesättigt)
- Chloroform/Isoamylalkohol (48:2)
- Ethanol (70 %ig)
- Formaldehydlösung (35 %ig)
- Isopropanol

Die bei der Präparation verwendeten Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml) sollten RNase-frei sein. Hierzu ist in der Regel keine weitere Reinigung der von der Fa. Eppendorf erhältlichen Gefäße notwendig. Während der gesamten Prozedur muß darauf geachtet werden, daß mögliche Kontaminationen der RNA-Lösung durch RNase weitestgehend ausgeschlossen sind. So sollten beim Arbeiten mit RNA stets Einweg-Handschuhe getragen werden.

Zur Aufarbeitung der HepG2-Zellen wird das Inkubationsmedium abgesaugt und 300 µl Guanidiniumthiocyanat-Lösung pro 6 cm-Schale zu den Zellen gegeben. Durch die Lyse der Zellen entsteht eine gallertartige Lösung, die vorsichtig in ein Eppendorf-Gefäß überführt wird. An dieser Stelle kann die Arbeit unterbrochen werden, da die RNA in der Guanidiniumthiocyanat-Lösung vor RNasen geschützt ist. Die Proben können daher an dieser Stelle der Präparation mehrere Monate bei -70 °C gelagert werden.

Zur weiteren Verarbeitung wird das Lysat mit 30 µl Natriumacetat-Puffer pH 4,0 angesäuert und nach Zugabe von 300 µl Phenol (H<sub>2</sub>O-gesättigt) kräftig extrahiert. Die Mischung

bleibt anschließend 15 min auf Eis stehen und wird dann bei 10.000 x g zentrifugiert. Hierbei bildet sich zwischen der oberen Phase (RNA-Lösung) und der unteren Phase (Phenol) eine milchig-trübe Schicht, die unter anderem die gesamte DNA des Lysates enthält. Die obere Phase wird abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben. Bei diesem Schritt ist darauf zu achten, daß keine Interphase mitgesaugt wird und die RNA-Lösung verunreinigt (besser eine etwas geringere Ausbeute einkalkulieren). Anschließend wird die RNA-Lösung mit 66 µl Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und nach erneuter Zentrifugation die obere Phase (RNA-Lösung) vorsichtig abgenommen und in ein weiteres Eppendorf-Gefäß überführt. Durch Zugabe von Isopropanol im Verhältnis 1:1 wird die RNA gefällt. Nach gutem Mischen verbleibt die Fällung für ca. 1 h bei -20 °C. An dieser Stelle kann die Präparation wiederum unterbrochen werden.

Anschließend wird die RNA 20 min bei 10.000 x g abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen und das verbleibende Pellet in 300 µl Guanidiniumthiocyanat-Lösung gelöst. Dieser Schritt kann Probleme bereiten, da die RNA z.T. nur schlecht wieder in Lösung geht. Unter Umständen muß die Mischung erwärmt werden. Durch erneute Zugabe von Isopropanol im Verhältnis 1:1 wird die RNA ein zweites Mal gefällt und wie bereits beschrieben weiter aufgearbeitet. Das resultierende Pellet wird mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach Abgießen des Ethanols an der Luft getrocknet. Die RNA wird dann in 50 µl Wasser (Diethylpyrocarbonat-behandelt) gelöst und nach Zugabe von 35 µl Formaldehyd-Lösung 10 min auf 65 °C erwärmt. Die so präparierte RNA kann bei -70 °C mehrere Monate aufbewahrt werden.

#### **4.9.2.5 Herstellung der Dot-Blots von HepG2-Gesamt-RNA**

##### **Reagenzien und Lösungen**

35 %iger Formaldehyd

1 mol/l Ammoniumacetat pH 7,0

20 x SSC:

(1 x SSC = 0,15 mol/l Natriumchlorid,

0,015 mol/l tri-Natriumcitrat)

Nitrocellulose BA 85, 0,45 µm Porengröße (Schleicher & Schüll, Nr. 401196)

25 µl der RNA-Lösung werden mit 20 µl Formaldehyd-Lösung gemischt und 10 min auf 65 °C erwärmt. Anschließend wird die Mischung mit 355 µl 20 x SSC auf 400 µl aufgefüllt. Die Nitrocellulose wurde während dessen nach Anfeuchten in Wasser 10 min in 10 x SSC präinkubiert und anschließend in eine 96-Loch-Filterereinheit eingespannt. Es ist wichtig, daß die Membran nicht eintrocknet. Von den vorbereiteten RNA-Lösungen in SSC werden 2 x 100 µl aufgetragen. Hierbei ist darauf zu achten, die Proben in zwei verschiedenen Bereichen der Filtrationseinheit aufzutragen, da die Membran im Anschluß an die Prozedur zerschnitten wird und zwei identische Probenmuster resultieren sollen. Nachdem alle Proben aufgetragen sind, wird ein schwaches Vakuum angelegt, um die Lösung langsam abzusaugen (0,5-1 min). Das Vakuum wird dann abgestellt und in jedes Probenloch 100 µl 1 mol/l Ammoniumacetat-Lösung gegeben. Nach langsamem Durchsaugen der Lösung wird das Filter - wie erwähnt - geteilt, an der Luft getrocknet und 1 h bei 80 °C im Vakuum gebacken. Der Dot-Blot kann dann hybridisiert werden.

#### **4.9.2.6 Hybridisierungsproben**

##### **4.9.2.6.1 Beschreibung der Plasmide pSPT18LDLR und pTZ19ß-Tub**

###### **a) pSPT18LDLR**

Das Plasmid pSPT18 (Pharmacia Nr. 27-3510-01) ist zur Herstellung von In-vitro-Transkripten aus klonierter DNA geeignet. Die Transkription kann sowohl mit Hilfe der SP6-RNA-Polymerase als auch mit T7-RNA-Polymerase erfolgen.

In diesen Vektor wurde ein BamHI/PstI-Fragment der Human-LDL-Rezeptor-cDNA nach Standardmethoden (Maniatis et al., 1982) kloniert, das aus dem Plasmid pLDLR3 (ATCC Nr. 57005) stammte. Das Fragment kodiert für die Sequenz von Aminosäure 444 (Asp) bis 637 (Ala) des Human-LDL-Rezeptors.

b) *pTZ19 $\beta$ -Tubulin*

Das Plasmid pTZ19 (Pharmacia Nr. 27-4984-01) ist ebenfalls zur In-vitro-Transkription geeignet. In diesen Vektor wurde ein Eco-RI/Bam-HI-Fragment des  $\beta$ -Tubulin-Gens nach Standardmethoden kloniert. Das 250bp-Fragment stammt aus dem Plasmid 21beta 3'UT (ATCC Nr. 57105).

4.9.2.6.2 *Plasmidpräparationen (pSPT18LDLR, pTZ18 $\beta$ -Tubulin)*

a) *Puffer, Lösungen und Reagenzien:*

Anzuchtmedium "Superbroth":

A:           12 g Trypton  
             24 g Hefeextrakt  
             5 ml Glycerin

in 900 ml bidest. Wasser lösen und autoklavieren

B:           3,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
             12,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

in 100 ml bidest. Wasser lösen und autoklavieren

Medium: Lösung A und B mischen

TE-Puffer:   10 mmol/l Tris x HCl pH 7,5  
             1 mmol/l EDTA

EDTA-Lösung: 0,25 mol/l, pH 8,0

Lysozymlösung: 10 mg/ml

Triton-Lösung: 3 ml 10 % Triton X100  
              25 ml 0,25 mol/l EDTA-Lösung pH 8,0  
              5 ml 1 mol/l Tris x HCl pH 8,0  
              67 ml  $\text{H}_2\text{O}$

Caesiumchlorid: fest

Ethidiumbromid-Lsg.: 10 mg/ml

Caesiumchlorid-Lsg.: 33,3 g Caesiumchlorid  
                      34,9 ml TE-Puffer  
                      1,13 ml Ethidiumbromid-Lösung

Paraffinöl

Butanol

Natriumacetat-Lösung: 3 mol/l, pH 4,2

Ethanol (absolut)

Suspensionspuffer: 50 mmol/l Tris x HCl pH 8,0  
                     25 % w/v Sucrose

Eine Kolonie Plasmid-tragender Bakterien wird in 5 ml Medium, das 200 mg/ml Ampicillin enthält, überführt und zur Anzucht über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur

werden 500 ml des gleichen Mediums (Superbroth mit Ampicillin) angeimpft und zur weiteren Anzucht bei 37 °C ca. 24 h kräftig geschüttelt. Die Kultur wird anschließend bei ca. 2.500 x g 10 min zentrifugiert und die Bakterien nach Abgießen des Überstandes vorsichtig in 30 ml TE-Puffer resuspendiert. Diese und alle noch folgenden Mengenangaben beziehen sich auf jeweils 250 ml Ausgangskultur. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 2,8 ml Suspensionspuffer (kalt) aufgenommen und das Gemisch mit 280 µl Lysozym-Lösung versetzt. Die Lysozym-Lösung sollte frisch mit Suspensionspuffer angesetzt werden. Nach vorsichtigem Mischen wird die Suspension 5 min auf Eis inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion werden 1,2 ml 0,25 mol/l EDTA-Lösung zugesetzt und der Ansatz wiederum 5 min auf Eis inkubiert. Die Lyse der Bakterien erfolgt nach Zugabe von 4,5 ml kalter Triton-Lösung. Der Ansatz verbleibt während der Lyse 10 min auf Eis und sollte von Zeit zu Zeit vorsichtig gemischt werden. Eine gute Lyse ist dann erfolgt, wenn der Ansatz gelartig und fast klar geworden ist. Sollte dies nicht der Fall sein, so kann eine längere Inkubation erfolgen oder der Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt werden. Die Zelltrümmer werden bei 25.000 Upm in einem SW27-Rotor (Beckman) abzentrifugiert (30 min, 4 °C). Hierzu werden die Lyse-Ansätze vereinigt und in ein Ultrazentrifugenröhrchen gegeben. Das Restvolumen des Röhrchens wird mit TE-Puffer aufgefüllt.

Nach erfolgter Zentrifugation bei 25.000 Upm wird der Überstand abgenommen (28 ml), 24,8 g Caesiumchlorid zugefügt und dieser unter Schütteln gelöst. Nach Zugabe von 4,5 ml Ethidiumbromid-Lösung wird die Lösung in verschweißbare Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und diese nach Auffüllen mit Paraffinöl verschweißt. Die Ultrazentrifugation erfolgt im Festwinkelrotor bei 45.000 Upm (70Ti, Beckman) bei 20 °C für 48 h. Anschließend wird die Plasmid-Bande abgesaugt, die Lösung in neue Röhrchen gefüllt und mit Caesiumchlorid-Lösung vollständig aufgefüllt. Die zweite Zentrifugation erfolgt ebenfalls bei 45.000 Upm und 20 °C für 48 h im Festwinkelrotor (50 Ti, Beckman). Nachdem die Plasmidbande abgesaugt ist, wird die Lösung zur Entfernung des Ethidiumbromids mit dem gleichen Volumen Butanol (wassergesättigt) extrahiert. Zur vollständigen Entfernung sind ca. 2-3 Extraktionen notwendig. Die extrahierte DNA-Lösung wird gegen 3 x 1 l TE-

Puffer (autoklaviert) dialysiert und die DNA nach Zugabe von Natriumacetat-Lösung (Endkonzentration: 0,3 mol/l) mit dem doppelten Volumen Ethanol (kalt) gefällt. Die DNA wird bei ca. 12.000 x g abzentrifugiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknen der DNA an der Luft wird sie in 200-500 µl TE-Puffer gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

#### *4.9.2.6.3 Bestimmung der DNA-Konzentration*

1 µl der DNA-Lösung wird mit 1 ml Wasser verdünnt und die Extinktion in Quarzküvetten bei 260 nm und 280 nm gemessen.

Die Konzentration berechnet sich aus der Annahme, daß 50 µg DNA in 1 ml Wasser gelöst eine Extinktion von 1 haben soll, d.h.  $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg}$  doppelsträngige DNA. Der Quotient aus den Messungen bei 260 nm und 280 nm sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Außerdem sollte die DNA mit Hilfe eines Agarose-Gels auf mögliche Verunreinigung durch RNA überprüft werden.

#### *4.9.2.6.4 Restriktionsschnitte der präparierten Plasmide pSPT18LDLR und pTZ19ß-Tubulin*

##### *Puffer, Lösungen und Reagenzien*

10 x Restriktionspuffer B und M (Boehringer, MA)  
Restriktionsendonuklease BamHI (10 U/µl)  
Restriktionsendonuklease PvuII (10 U/µl)  
Plasmid-Lösungen (4.9.2.6.2)  
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 50:49:1  
Chloroform/Isoamylalkohol 49:1

ca. 50 µg der Plasmide werden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in einem 200 µl-Ansatz geschnitten.

Die Zusammensetzung der Ansätze ist wie folgt:

x µl	pSPT18LDLR (ca. 50 µg)
20 µl	10 x Restriktionspuffer B
5 µl	BamHI (50 U)
y µl	<u>Wasser</u>
200 µl	

x µl pTZ19β-Tub  
 20 µl 10 x Restriktionspuffer A  
 5 µl PvuII  
y µl Wasser  
 200 µl

Die Ansätze werden 1 h bei 37 °C inkubiert und ein Aliquot zur Kontrolle des Restriktionsschnittes auf einem 1 % Agarose-Gel analysiert. Die Ansätze werden anschließend einmal mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die Fällung der DNA erfolgt nach Zugabe von 20 µl 3 mol/l Natriumacetat-Lösung mit ca. 440 µl Ethanol (kalt). Nach Zentrifugation, Waschen mit 70 %igem Ethanol und Trocknung im Vakuum wird die DNA in TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Konzentration sollte bei ca. 1 µg/µl liegen.

#### 4.9.2.6.5 Herstellung der <sup>32</sup>P-markierten Riboproben

##### *Puffer, Lösungen und Reagenzien*

10 x Transkriptionspuffer:  
 0,5 mol/l Tris x HCl pH 7,5  
 0,1 mol/l MgCl<sub>2</sub>  
 0,05 mol/l Dithiothreitol

##### *Nucleosidtriphosphat-Mix:*

10 mmol/l Adenosintriphosphat  
 10 mmol/l Guanosintriphosphat  
 10 mmol/l Uridintriphosphat

29,6 TBq/mmol [α-<sup>32</sup>P]-Cytidintriphosphat (800 Ci/mmol)  
 20 U/µl RNase-Inhibitor  
 10 U/µl SP6-RNA-Polymerase  
 10 U/µl T7-RNA-Polymerase  
 10 U/µl DNase I, RNase-frei

Ca. 0,5 µg des geschnittenen und phenolisierten Plasmides (1 µl Lösung) werden zusammen mit 1 µl 10 x Puffer, 1,5 µl dNTP-Mix, 0,5 µl RNase-Inhibitor sowie 1 µl SP6-RNA-Polymerase (LDL-Rezeptor-Probe) oder 1 µl T7-RNA-Polymerase (β-Tubulin) gemischt; zuletzt werden 5 µl [α-<sup>32</sup>P]-CTP (5,92 TBq, 50 µCi) hinzugefügt. Nach gutem Mischen wird der Ansatz 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die DNA mit RNase-freier DNase abgebaut (1 µl DNase, 15 min bei 37 °C).



Der gesamte Ansatz kann so direkt für Hybridisierungen eingesetzt werden.

#### **4.9.2.6.6 Bestimmung des Anteils an in RNA eingebauter Radioaktivität (TCA-Fällung)**

##### **Reagenzien und Lösungen**

10 % w/v Trichloressigsäure (TCA)

10 mg/ml Rinderserumalbumin-Lösung

0,5 µl des Markierungsansatzes werden mit 30 µl Rinderserumalbumin-Lösung gemischt und 400 µl 10 %ige Trichloressigsäure (kalt) hinzugegeben. Nach gutem Mischen bleibt der Ansatz 30 min auf Eis stehen und wird anschließend 5 min bei ca. 16.000 x g zentrifugiert (Mikrozentrifuge). Der Überstand wird verworfen und der Rückstand einmal mit 400 µl eiskalter TCA-Lösung gewaschen. Nach erfolgter Zentrifugation wird der Überstand abermals verworfen und die Aktivität im verbleibenden Rückstand nach dem Cerenkov-Verfahren (Szintillationszähler) bestimmt. Die Gesamtaktivität wird nach dem gleichen Zählverfahren in 0,5 µl Transkriptionsansatz bestimmt.

$$\text{Einbaurate in \%} = \frac{\text{cpm (TCA-Fällung)}}{\text{cpm (Ansatz)}} \times 100$$

Üblicherweise liegen die Einbauraten zwischen 30 und 70 %.

Für die weiteren Arbeiten können auch Ansätze mit einer kleineren Einbaurate verwendet werden, da die in vitro synthetisierte Riboprobe immer die gleiche spezifische Aktivität besitzt.

#### **4.9.2.7 Hybridisierung von auf Nitrocellulose immobilisierter RNA (Dot- oder Northern-Blot)**

##### **Puffer und Lösungen**

###### **Hybridisierungslösung:**

50 % Formaldehyd

5 x SSC (1 x SSC = 0,15 mol/l Natriumchlorid + 0,015 mol/l tri-Natriumcitrat)

0,1 % SDS (w/v)

1 x Denhardts (0,02 % Ficoll, 0,02 % PVP, 0,02 % BSA)

50 mmol/l Natriumphosphat-Puffer pH 7,0

1 mg/ml Heringsspermien-DNA-Lösung

#### Waschlösungen:

- 1 x SSC/0,5 % Natriumlaurylsulfat (SDS)
- 0,1 x SSC/0,1 % Natriumlaurylsulfat (SDS)

Die Nitrocellulose wird in eine Kunststoffdose gelegt, die 20 ml Hybridisierungslösung enthält, und 200 µl denaturierte Heringsspermien-DNA-Lösung werden zugefügt. Zur Denaturierung wird die DNA 10 min auf ca. 100 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Vorhybridisierung erfolgt dann für 4 h bei 45 °C. Die Vorhybridisierungslösung wird nach der Inkubation gegen 20 ml frische Hybridisierungslösung ausgetauscht und 2 x 10<sup>5</sup> cpm/ml (fällbare Aktivität im Transkriptionsansatz) an Riboprobe zugegeben. Zur Hybridisierung wird die Nitrocellulose mit der Probe über Nacht bei 45 °C inkubiert. Anschließend wird das Filter zweimal mit 1 x SSC; 0,5 % SDS bei 65 °C gewaschen und diese Prozedur mit 0,1 x SSC; 0,1 % SDS wiederholt. Das so behandelte Filter wird in Frischhaltefolie verpackt.

#### *4.9.2.8 Autoradiographie der hybridisierten Filter*

##### *Material und Lösungen:*

Röntgenfilm X-Omat AR	Kodak
Filmkassette mit Verstärkerfolie	Dr. Goos
Röntgenfilmentwickler	
Fixierer	
Essigsäure (1 %ig)	

Der hybridisierte Blot wird bei -70 °C mit Verstärkerfolie autoradiographiert und der Film anschließend mit Essigsäure als Stopppad entwickelt.

#### *4.9.2.9 Auswertung der Autoradiogramme*

Mit Hilfe eines Laserdensitometers (Ultrosan XL, LKB) wird die optische Dichte der Schwärzungen des Autoradiogramms gemessen. Um eine quantitative Aussage über die Menge an hybridisierter Probe machen zu können, eignet sich die Fläche unter den Peaks des Densitogramms besser als die Peakhöhe. Dies liegt unter anderem daran, daß ab einem bestimmten

Belichtungsstadium die Schwärzung am Rand der belichteten Filmfläche stärker zunimmt als in der Mitte.

Die Berechnung des Faktors, um den sich der LDL-Rezeptor-mRNA-Spiegel gegenüber dem der  $\beta$ -Tubulin-mRNA ändert, erfolgt nach der Gleichung:

$$F = \frac{\text{LDLR}(+)}{\beta\text{-Tub}(+)} \times \frac{\beta\text{-Tub}(-)}{\text{LDLR}(-)}$$

LDLR(+) = gemessene Absorption in AU x mm (= Fläche der Peaks, die durch Densitometrie ermittelt wurden) für die Hybridisierung mit der LDL-Rezeptor-Riboprobe nach Inkubation der Zellen mit Testsubstanz

$\beta$ -Tub(+) = gemessene Absorption in AU x mm bei Hybridisierung der RNA aus der selben Präparation, jedoch mit  $\beta$ -Tubulin-Riboprobe

LDLR(-) = gemessene Absorption in AU x mm einer Kontrolle, d.h. RNA aus Zellen, die nicht mit Substanz inkubiert wurden. Hybridisierungsprobe: LDL-Rezeptor-Riboprobe

$\beta$ -Tub(-) = gemessene Absorption in AU x mm bei Hybridisierung der RNA aus der selben Präparation wie LDLR(-), jedoch mit der  $\beta$ -Tubulin-Riboprobe hybridisiert

#### 4.9.3 Ergebnisse und Diskussion

Die routinemäßige Anwendung eines auf Hybridisierung basierenden Expressionsassays erfordert von vornherein eine Ausrichtung der Bestimmung auf möglichst einfache reproduzierbare Methoden. Dies beinhaltet sowohl die Präparation zellulärer RNA, die Herstellung der markierten Hybridisierungsprobe, als auch die Hybridisierung selbst.

Zur Präparation der Gesamt-RNA aus Zellen in Kultur erwies sich in unserem Labor die beschriebene Guanidiniumthiocyanat-Methode als die für die standardmäßige Anwendung am besten geeignete. Die Methode hat gegenüber vielen anderen in der Literatur beschriebenen den Vorteil, daß sich die RNA während der Prozedur ständig in einem Milieu befindet, in dem sie vor der Hydrolyse durch Ribonukleasen geschützt ist. Für eine routinemäßig durchgeführte Präparation kleiner RNA-Mengen (bis zu 60 Präparationen parallel) kann dieser Schutz nur durch ständige Gegenwart von RNase-Inhibitoren und nicht

allein durch extrem vorsichtiges Arbeiten gewährleistet werden.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, daß die auf relativ einfache Weise gewonnene RNA gut filtrierbar ist und sich daher für die Anfertigung von Dot-Blots eignet. Alle anderen getesteten Methoden (Grimes et al., 1988; Wilkinson, 1988; Goughs, 1988) lieferten entweder eine zu geringe Ausbeute oder bei hoher Ausbeute eine schlecht filtrierbare RNA. Es muß an dieser Stelle jedoch betont werden, daß die Präparation von RNA immer noch eine sehr arbeitsaufwendige Methode ist und bei der routinemäßigen Anwendung durchaus Proben mit kaum meßbarem RNA-Gehalt auftreten.

Ein weiteres Problem ist die routinemäßige Markierung von Hybridisierungsproben. Die übliche Methode der Markierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der DNA-Polymerase erfordert meistens die Präparation dieser Fragmente in relativ großen Mengen. Da die Präparation jedoch häufig von Problemen - besonders im Hinblick auf die Ausbeute - begleitet ist, wurde von uns der Weg der routinemäßigen Synthese einer markierten Riboprobe gewählt. Trotz anfänglicher Probleme bei der Markierungsausbeute erweist sich diese Methode heute im Screeningeinsatz als sehr zuverlässig und leicht durchführbar. Zur Synthese der in vitro markierten RNA muß das gewünschte DNA-Fragment lediglich in einen entsprechenden Vektor (z.B. pTZ-Serie, Pharmacia) kloniert werden. Das so gewonnene Konstrukt kann dann mit Hilfe der üblichen Methoden in beliebiger Menge hergestellt und nach einem einfachen Restriktionsschnitt zur Riboprobe-Synthese eingesetzt werden. Die höhere Empfindlichkeit der markierten Probe gegen enzymatischen Abbau erwies sich als nicht problematisch.

Zur Messung des hybridisierten Anteils an Riboprobe wurde die autoradiographische Auswertung der Dot-Blots gewählt, da in diesem Verfahren eine große Zahl an Proben gleichzeitig bearbeitet werden kann, ohne daß die Einzelschritte, bei denen mit radioaktivem Material gearbeitet wird, zunehmen. An dieser Stelle sei bemerkt, daß z.Z. eine "nicht-radioaktive" Markierung der Riboprobe getestet wird.

Die Auswertung über Autoradiogramme wirft jedoch einige Probleme auf, da die Zunahme der Schwärzung des Röntgenfilms

nicht proportional zum Anstieg der spezifischen Hybridisierung ist. Um trotzdem eine ungefähre Aussage über die tatsächliche Änderung des mRNA-Spiegels in den Zellen machen zu können, wurde die Abhängigkeit der Schwärzung des Röntgenfilms von der Konzentration einer mRNA in einer gegebenen RNA-Präparation gemessen.

Um diese Messung durchzuführen, wurde in vitro eine RNA synthetisiert, die komplementär zur Riboprobe für den LDL-Rezeptor war, also ein kurzes Stück der Rezeptor mRNA darstellt. Diese Synthese konnte leicht durchgeführt werden, da das entsprechende LDL-Rezeptor-cDNA-Fragment in den In-vitro-Transkriptionsvektor pSPT 18 kloniert worden war, der mit Hilfe von SP6- oder T7-RNA-Polymerase eine Synthese der beiden möglichen RNA's erlaubt. Vom In-vitro-Transkript wurden entsprechende Verdünnungen hergestellt und diese mit jeweils gleichen Mengen an Gesamt-RNA aus CHO-(chinese hamster ovary)-Zellen gemischt. Die densitometrische Auswertung (Abb. 4.62) der mit der LDL-Rezeptor-Riboprobe hybridisierten Dot-Blots ergab die dargestellte Abhängigkeit (Abb. 4.63). Mit Hilfe dieser Messungen könnten Änderungen in der Schwärzung des Röntgenfilms auf die Änderung des Gehalts an Rezeptor-mRNA umgerechnet werden.

Für die routinemäßige Auswertung der Dot-Blots im Substanz-Screening wird jedoch ein auf die  $\beta$ -Tubulin-mRNA korrigierter Faktor berechnet, der die Änderung des LDL-Rezeptor-mRNA-Spiegels in HepG2-Zellen bei Inkubation mit Testsubstanzen angibt. Bei dieser Berechnung wird das Verhältnis von LDL-Rezeptor-mRNA zu  $\beta$ -Tubulin-mRNA in HepG2-Zellen als konstant angesehen, solange sich die Inkubationsparameter nicht ändern. Eine eventuelle Substanzwirkung würde dieses Verhältnis um den berechneten Faktor ändern.

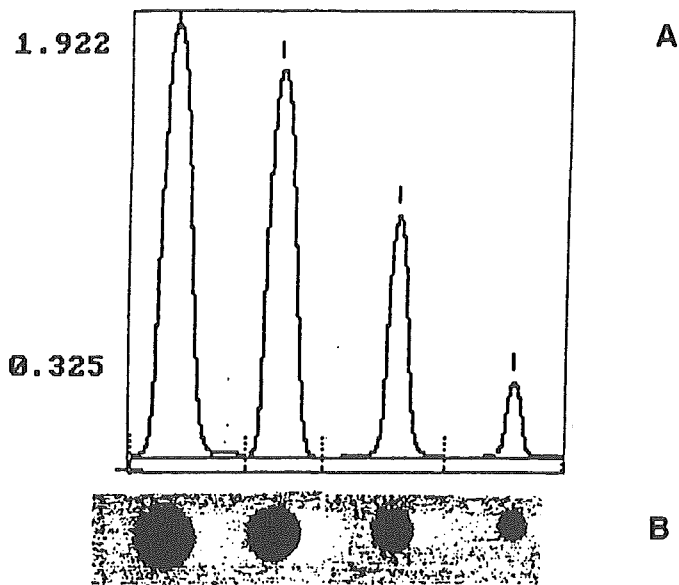
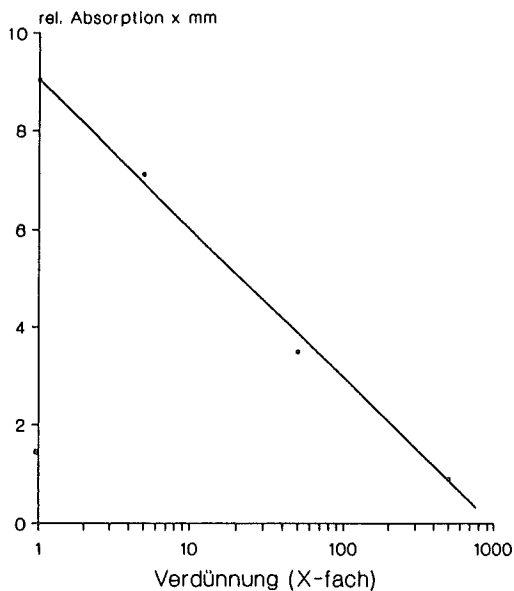


Abb. 4.62: Eine *in vitro* synthetisierte RNA (komplementär zu der humanen LDL-Rezeptor-Riboprobe) wurde in verschiedenen Verdünnungen mit einer konstanten Menge Gesamt-RNA aus "chinese hamster ovary (CHO)"-Zellen gemischt. Die Mischungen wurden auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und mit einer für den menschlichen Rezeptor spezifischen Riboprobe hybridisiert. (A) zeigt das Densitogramm des Autoradiogramms (B). Die Verdünnung an spezifischer RNA war 1fach, 5fach, 50fach und 500fach.



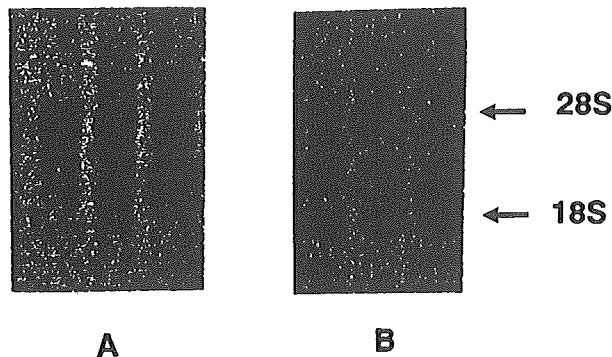
**Abb. 4.63:** Die densitometrische Auswertung der in Abb. 4.62 illustrierten Untersuchung zeigt einen logarithmischen Zusammenhang zwischen der optischen Dichte ( $AU \times mm$ ) und der Verdünnung der spezifischen RNA.

Zur Auswertung der Dot-Hybridisierung ist neben den beschriebenen Messungen ein "interner Standard" als Bezugsgröße unbedingt notwendig. Üblicherweise wird hierzu die mRNA eines Proteins des Cytoskeletts der Zelle benutzt, wie z.B.  $\beta$ -Aktin (für Nicht-Muskelzellen) oder  $\beta$ -Tubulin. Diese Bezugsgröße ist vor allem deshalb notwendig, um Schwankungen bei der RNA-Ausbeute zu berücksichtigen. Die  $\beta$ -Tubulin-mRNA hat sich in unserem Labor bewährt und wird bei jeder Messung parallel zur LDL-Rezeptor-mRNA bestimmt. Hierzu wird die in vitro synthetisierte "Riboprobe" eines Fragments des Human- $\beta$ -Tubulin-Pseudogens verwendet. Letztendlich wird somit bei der Auswertung das Verhältnis LDL-Rezeptor-mRNA zur  $\beta$ -Tubulin-mRNA bestimmt. Für das Substanz-Screening ergibt sich hieraus das Problem, daß auch die negative Beeinflussung der  $\beta$ -Tubulin-mRNA zu einer Erhöhung des gemessenen Verhältnisses führt. Verbindungen mit einer solchen Wirkung würden jedoch zytotoxische Effekte an den kultivierten Zellen zeigen.

Die Anwendung von Dot-Blots zur Bestimmung des LDL-Rezeptor-mRNA-Spiegels setzt voraus, daß die Hybridisierungstemperatur und Salzkonzentration der Waschlösungen in Vorexperimenten ausgetestet werden. Dies kann nur anhand von Northern-Blots

der zu untersuchenden RNA-Präparationen geschehen, da hier im Gegensatz zum Dot-Blot zwischen spezifischer und eventuell unspezifischer Hybridisierung unterschieden werden kann. Daher wurden RNA-Präparationen aus HepG2-Zellen nach gelelektrophoretischer Trennung auf Nitrocellulose übertragen und sowohl mit der LDL-Rezeptor-mRNA-spezifischen Riboprobe als auch mit der Riboprobe für  $\beta$ -Tubulin-mRNA hybridisiert. Ausreichend spezifische Hybridisierungen konnten bei 45 °C in 50 % Formamid mit anschließendem Waschen der Filter in 0,1 x SSC; 1 % SDS bei 65 °C erreicht werden. In Abbildung 4.64 sind zwei Autoradiogramme von Northern-Blots mit HepG2-Gesamt-RNA gezeigt, die mit LDL-Rezeptor-Riboprobe (A) sowie mit der Riboprobe für  $\beta$ -Tubulin (B) hybridisiert wurden. Die Autoradiogramme zeigen deutlich, daß sowohl die Rezeptor-mRNA (5,3 kb) als auch die beiden mRNA's für  $\beta$ -Tubulin ohne weitere Anreicherung der poly(A<sup>+</sup>)-RNA zu detektieren sind. Nach diesen Vorexperimenten konnten die Dot-Hybridisierungen unter den genannten Bedingungen durchgeführt werden.





**Abb. 4.64:** Die spezifischen Hybridisierungseigenschaften der beiden für das Screeningmodell vorgesehenen Proben wurde mittels "Northern-Blotting" der Gesamt-RNA von HepG2-Zellen getestet.

(A) zeigt das Autoradiogramm eines Northern-Blots nach Hybridisierung mit einer LDL-Rezeptor-spezifischen Riboprobe. Das Hybridisierungssignal liegt in dem erwarteten Bereich (513 kb).

In (B) wurde dieselbe RNA-Präparation mit einer Riboprobe für humanes  $\beta$ -Tubulin hybridisiert. Beide mRNA-Banden des  $\beta$ -Tubulins (1,8 bzw. 2,6 Kilobasen) sind leicht zu erkennen.

Die mit den Pfeilen markierten Positionen der 28S- und 18S-Ribosomen-RNA entsprechen einer Größe von 5,1 kb bzw. 1,9 kb.

Um reproduzierbare Bedingungen für die Bestimmung des LDL-Rezeptor-mRNA-Spiegels zu erreichen, müssen verschiedene Parameter bei der Kultivierung der Zellen berücksichtigt werden. Zum einen ist das Wachstumsstadium, in dem sich die Zellen befinden, für deren Reaktion auf äußere Einflüsse wichtig, zum anderen hat das Medium, in dem die Zellen wachsen, ebenfalls einen deutlichen Effekt auf die Expression des LDL-Rezeptors.

Zur Abklärung dieser Parameter wurde der Rezeptor-mRNA-Spiegel in HepG2-Zellen unter Zugabe eines HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors unter verschiedenen Inkubationsbedingungen gemessen. Von den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren ist bekannt, daß sie die Zahl der LDL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche erhö-

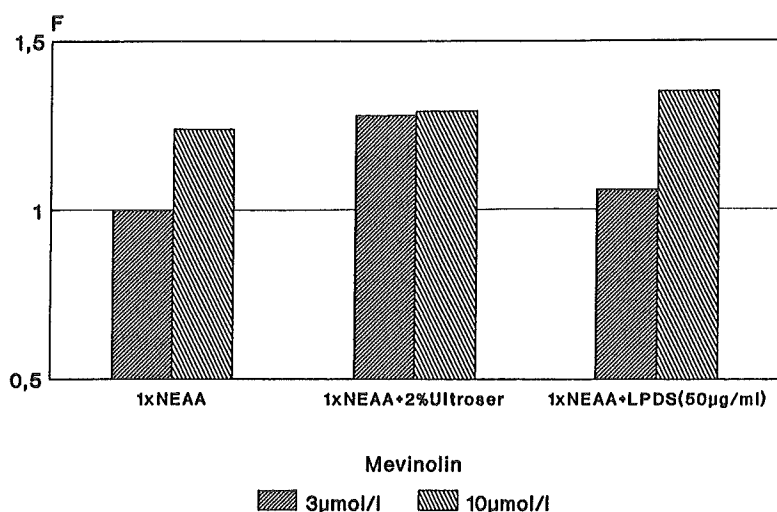
hen und diese Erhöhung mit einer erhöhten Transkriptionsrate einhergeht (Ma et al., 1986). Daher kann diese Substanzklasse als Referenz in den LDL-Rezeptoruntersuchungen eingesetzt werden.

In diesem Experiment wurden dem Medium (DMEM) verschiedene Zusätze zugefügt:

DMEM

- 1) + 1 x NEAA (nicht-essentielle Aminosäuren)
- 2) + 1 x NEAA + 2 % Ultrosor (eine Medienzusatz von BRL, der neben Albumin und Phospholipiden noch Insulin enthält)
- 3) + 1 x NEAA + Lipoprotein-freies Serum (LPDS),  
50 µg Protein/ml

Das Ergebnis des Experiments ist in Abbildung 4.65 dargestellt. Außer bei Zusatz von Ultrosor zum Medium ist erst bei 10 µmol/l Mevinolin ein deutlicher Effekt zu sehen. Bei dieser Konzentration liegt die Steigerung des mRNA-Spiegels bei allen Medienzusätzen bzw. beim Medium ohne jeden weiteren Zusatz (außer NEAA) in der gleichen Größenordnung. Der erhöhte mRNA-Spiegel bei der Inkubation der Zellen mit 3 µmol Mevinolin/l und 2 % Ultrosor gegenüber der Inkubation mit Mevinolin allein ist sehr wahrscheinlich auf den Insulingehalt dieses Zusatzes zurückzuführen. Unter Umständen besteht hier ein synergistischer Effekt zwischen diesem Hormon und dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde im Screening die Medienzusammensetzung wie unter 1) beschrieben eingesetzt. Es wurde also zum Grundmedium außer den nicht-essentiellen Aminosäuren kein weiterer Zusatz hinzugefügt. Die so erreichten Inkubationsbedingungen für die Zellen entsprechen denen im LDL-Bindungsassay (Kap. 4.8) und bedingen eine größere Vergleichbarkeit der beiden Modelle. Das Ergebnis zeigt aber auch gleichzeitig die relative Unempfindlichkeit der mRNA-Bestimmung. Während im LDL-Bindungsmodell mit Mevinolin bereits bei einer Konzentration von 3 µmol/l ein deutlicher Effekt (50-80 % Erhöhung der LDL-Bindung) erreicht wird, ergibt die Messung des LDL-Rezeptor-mRNA-Spiegels kaum Veränderung. Dieses Ergebnis wurde in weiteren Experimenten bestätigt, so daß die Messung einer Konzentrationsabhängigkeit des vorhandenen mRNA-Spiegels z.T. Schwierigkeiten bereitet.



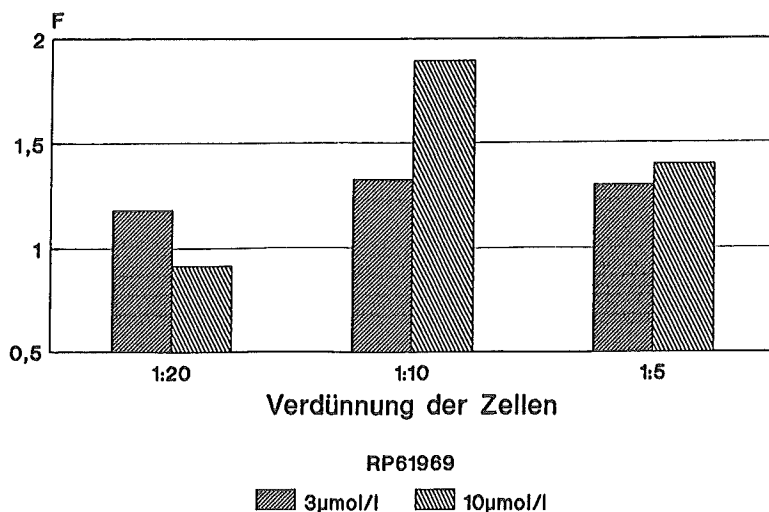
*Abb. 4.65: Drei verschiedene Kulturmedien wurden ausgetestet, um geeignete Bedingungen für die Detektion von Substanzeffekten auf den LDL-Rezeptor-mRNA-Level zu finden. Außer bei den Ansätzen mit Ultrosor, eine Zusatz für Kulturmedien von den "Bethesda Research Laboratories", konnte ein konzentrations-abhängiger Effekt von Mevinolin auf die mRNA-Konzentration gemessen werden. Weil kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen mit bzw. ohne lipoprotein-freier Serumzusatz bestand, verzichteten wir auf weitere Zusätze außer nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA).*

Ein weiterer Parameter mit Einfluß auf die Höhe der Expression des LDL-Rezeptors ist das Wachstumsstadium, in dem sich die Kultur befindet. So wird unter konfluenten Bedingungen deutlich weniger Rezeptor-mRNA gebildet als im halbkonfluenten Zustand (H. Kraft; Innsbruck, pers. Mitteilung). Um die für unser Versuchsdesign optimale Zelldichte zu testen, wurden verschiedene Verdünnungen von Zellen angesetzt und nach einer Anwachs- und Nüchternphase das Verhältnis von Rezeptor-mRNA zu  $\beta$ -Tubulin-mRNA unter Einfluß eines HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors (RP 61969) bestimmt. Die Auswertung dieses Experiments ist in Abbildung 4.66 und Tabelle 4.18 dargestellt. Unter den hier erwähnten Bedingungen ergibt sich ein Expressionsmaximum, wenn der Reduktaseinhibitor den Zellen bei einem Wachstumszustand von ca. 80 % Konfluenz zugesetzt wird. Für den Splittrhythmus ergab sich hieraus eine Rate von 1:10, d.h. man verteilt die Zellen einer 10-cm-Schale auf 10 6 cm-

Schalen und läßt bis zu 80 % Konfluenz anwachsen, da hier die beste Reaktion der Zellen auf die Substanz zu erwarten ist.

*Tab. 4.18: Auswertung eines Zellverdünnungsexperimentes.  
RNA-Proben wurden aus Zellen präpariert, die zuvor in Anwesenheit (+) bzw. in Abwesenheit (-) von RP 61969 (HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor) inkubiert worden waren.  
Der Faktor der Änderung der mRNA-Konzentration (F) wurde, wie im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben, errechnet.  
AU x mm entspricht der Peakfläche im Dot Blot.*

		[AU x mm]		[AU x mm]		[AU x mm]	
		1:20	F	1:10	F	1:5	F
LDLR -	1)	2,997		2,218		3,919	
	2)	2,794		2,310		3,660	
$\beta$ -Tub -	1)	7,358		15,358		7,119	
	2)	7,232		13,026		5,946	
<i>RP 61969 (3 <math>\mu</math>mol/l)</i>							
LDLR +	1)	3,030	0,92	2,470	1,29	2,571	1,42
	2)	3,376	1,45	3,243	1,37	3,470	1,18
$\beta$ -Tub +	1)	8,072		13,283		3,296	
	2)	6,041		13,348		4,768	
<i>RP 61969 (10 <math>\mu</math>mol/l)</i>							
LDLR +	1)	2,635	0,9	3,036	1,99	5,363	1,19
	2)	2,909	1,3	3,502	1,8	5,196	1,61
$\beta$ -Tub +	1)	7,236		10,534		8,166	
	2)	5,831		10,992		5,240	



*Abb. 4.66: HepG2-Zellen wurden in der angegebenen Verdünnung subkultiviert, bevor die Testsubstanz (RP 61969, ein HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor von Rhône-Poulenc) dem Kulturmedium zugesetzt wurde. Bei der Subkultivierung aus einer Petrischale mit  $\phi = 10$  cm auf zehn Petrischalen mit  $\phi = 6$  cm (definiert als 1:10-Verdünnung) wurde die stärkste Reaktion der Zellen erhalten. Obwohl die Reaktion extrem von der Passagenzahl der Zellen abhängig ist, wird dieses Subkultivierungsverhältnis routinemäßig im Screeningmodell eingesetzt. Der negative Effekt bei einem Verhältnis von 1:20, besonders bei 10 µmol/l RP 61969, ist bisher nicht erklärbar.*

Mit Hilfe der genannten Experimente konnten Bedingungen für die Kultivierung der HepG2-Zellen ermittelt werden, die eine gut meßbare Reaktion auf die Zugabe eines HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors möglich machen. Für das Screening-Verfahren werden die Zellen daher nach Anzucht in Medium mit Serumzusatz einen Tag lang in reinem Kulturmedium ohne Serum gehalten, um standardisierte Bedingungen zu schaffen. Des weiteren wurde ein Splittrhythmus eingeführt, der die Zellen unter möglichst konstanten Wachstumsbedingungen hält und den Zellen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe eine Konfluenz von 60-80 % erlaubt. Die so erreichte Standardisierung läßt eine gute Vergleichbarkeit der gewonnenen Ergebnisse zu, das heißt, die zu erwartenden Differenzen in den Experimenten aufgrund der unterschiedlichen Splittnummer (entspricht dem "Alter" der Zellen) konnten minimiert werden. Das so entwickelte Modell wird z.Z.

im Screening nach antiatherosklerotisch wirkenden Substanzen  
als "second stage model" eingesetzt.

#### **4.10 Hemmung der Endothelzell-vermittelten Alterierung von LDL**

##### **4.10.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Inkubation von Kaninchenaortenzellen mit frisch isolierten Lipoproteinen geringer Dichte (LDL) führt zu einer auf oxidativen bzw. enzymatischen Prozessen beruhenden Modifizierung der LDL, die mit Hilfe der Messung der Veränderung der elektrophoretischen Beweglichkeit der Lipoproteine, des aus ungesättigten Fettsäuren freigesetzten Malondialdehyds mittels Thiobarbitursäure oder der Aufnahme dieser modifizierten Lipoproteine in Peritonealmakrophagen quantifiziert werden kann. Substanzen, die in diesem Prüfsystem wirksam sind, könnten in vivo die Entstehung von Schaumzellen und damit einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese der Atherosklerose verhindern.

##### **4.10.2 Material und Methoden**

###### **4.10.2.1 Zellen**

###### **a) Kaninchenaortenzellen**

Für die LDL-Modifizierung wird eine Kaninchenaorten-Primärkultur eingesetzt. Zur Präparation wird ein ca. 5 cm langes Aortensegment aus dem thorakalem Bereich frisch entnommen und die Blutreste durch intensives Waschen in PBS-Puffer (s. 4.10.2.2) entfernt. Adipöses Gewebe wird mittels sterilem Skalpell entfernt und die Aorta nach erneutem Waschen in PBS mit einer heißsterilisierten Schere (2 h, 180 °C) in ca. 5 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und 24 Stunden mit DMEM/10 % FKS/Dispase I (1 U/ml, Boehringer Mannheim, Nr. 210455) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Medium wird anschliessend bei 2.000 Upm abzentrifugiert (Labofuge 6000), das verbleibende Pellet einmal mit DMEM gewaschen und nach Zugabe von DMEM/10 % FKS erneut im Brutschrank 24 h inkubiert. Die nicht von der Dispase abgebauten Gewebsreste werden anschliessend abgesaugt und die adhärennten Kaninchenaortenzellen bis zur Konfluenz kultiviert.

Die eingesetzten Zellen sind seit 1986 in der 15. Passage in Kulturmedium unter Zusatz von 10 % DMSO bei -196 °C

kryokonserviert und werden zwischen der 18. und 25. Passage für die Versuche eingesetzt.

*b) Makrophagen-ähnliche Zelllinie*

Für LDL-Degradationsstudien wird die makrophagenähnliche Zelllinie J774A.1 (ATCC, Nr. TIB 67) - im Text abgekürzt mit J774 - eingesetzt.

Die Zellen sind in 10%igem DMSO in Kulturmedium bei -196 °C mit unbekannter Passagenzahl kryokonserviert.

*4.10.2.2 Kulturmedien und Puffer*

*a) Kulturmedium, Medienadditiva und Antibiotika:*

1. Minimum Essential Medium, nach Dulbecco (DMEM, Boehringer Mannheim Nr. 210048)
2. Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ , Merck Nr. 6323)
3. Streptomycinsulfat (Serva, Nr. 35500)
4. Penicillin G-Kaliumsalz (Serva, Nr. 31749)
5. Fötale Kälberserum (FKS, Seromed, verschiedene Chargen)
6. Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA, 100fach konzentriert, Boehringer Mannheim, Nr. 210293)
7. Natriumpyruvat (100 mmol/l, steril, Seromed, Nr. L0473)
8. L-Glutamin (200 mmol/l, steril, Boehringer Mannheim, Nr. 210277)
9. Rinderserumalbumin (BSA, Sigma A7906)

DMEM Pulverkonzentrat (für 5 l Medium)

- + 18,5 g  $\text{NaHCO}_3$
- + 0,5 g Streptomycinsulfat
- + 0,3 g Penicillin G (500.000 IU)

werden mit bidest. Wasser auf 5 l aufgefüllt und nach 15-30minütigem Rühren sterilfiltriert (Filter 0,2  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schüll, Nr. 401352).

Die NEAA werden vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Das FKS wird vor Gebrauch 10 %ig (v/v) dem Flüssigmedium zugesetzt. Für J774-Zellen wird FKS verwendet, welches zuvor 2 h bei 56 °C (Wasserbad) hitzeinaktiviert wird.

BSA wird als sterile 10 %ige Stammlösung in bidest. Wasser bei 4 °C gelagert und dem Flüssigmedium vor Gebrauch 1 %ig (v/v) zugesetzt.

Als DMEM-Medium wird grundsätzlich das Nährmedium ein-



schließlich  $\text{NaHCO}_3$ , NEAA und Antibiotika bezeichnet. Alle anderen Zusätze (FKS, BSA, Natriumpyruvat, L-Glutamin) werden gesondert aufgeführt.

*b) Zusammensetzung des PBS-Puffers*

Zum Waschen der Zellen wird "phosphate buffered saline" (PBS) verwendet:

- 8,0 g NaCl (Merck, Nr. 6404)
- 0,2 g KCl (Merck, Nr. 4936)
- 1,15g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma, Nr. S0876)
- 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Nr. 4873)

werden mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt - der pH-Wert der Lösung beträgt 7,0.

*4.10.2.3 Trypsinlösung*

100 ml 0,25 %ige Trypsinlösung (Flow, Nr. 1689454) werden mit 7 ml einer 1 %igen EDTA-Lösung (in sterilem PBS-Puffer) versetzt.

*4.10.2.4 Subkultivierung der Aorten- bzw. J774-Zellen*

Alle im folgenden beschriebenen Arbeitsgänge erfolgen unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank, sterile Verbrauchsware, Pipetten):

1. Medium absaugen
2. 2 ml Trypsinlösung zusetzen (bei NUNC-Petrischalen, d = 10cm, Nr. 150350) (entfällt bei J774-Zellen - diese Zellen werden mittels Gummiwischer abgeschabt und mit DMEM/10 % FKS in ein Zentrifugenröhrchen überführt - weiter mit 4.)
3. Nach 5 min bei 37 °C die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen pipettieren, in dem 2 ml DMEM/10 % FKS vorgelegt sind
4. Zentrifugation bei 2.000 Upm (Labofuge 6000, Heraeus), 1 min
5. Absaugen des Überstandes, Suspendieren des Zellpellets in 5 ml DMEM/10 % FKS
6. Zentrifugation wie 4.

7. Überstand absaugen, Zellpellet in 5 ml DMEM/10 % FKS aufnehmen und auf fünf neue Petrischalen verteilen, in denen 10 ml DMEM/10 % FKS vorgelegt sind. Bei J774-Zellen wird das Medium zusätzlich mit 1% L-Glutamin (v/v) und 1% Natriumpyruvat (v/v) versetzt.

#### 4.10.2.5 Einfrieren von Zellen

Punkt 1.-6. wie unter 4.10.2.4 beschrieben

7. Pellet suspendieren in 1 ml DMEM/10 % FKS/10 % DMSO (bei J774-Zellen wird das Medium zusätzlich mit 1% L-Glutamin (v/v) und 1% Natriumpyruvat (v/v) versetzt) und in eine Ampulle (NUNC, Nr. 363401) pipettieren.
8. Mit Einfrierstopfen (Union Carbide) auf Position "G" 2 h im Stickstoffbehälter belassen, danach alle 15 min eine Position tiefer setzen.

#### 4.10.2.6 Proteinbestimmung nach Lowry

##### Lösungen:

Reagenz A:	2,0 % $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,1 mol/l NaOH
Reagenz B:	1,0 % Kalium-Natrium-Tartrat 0,5 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ einzeln lösen, dann zusammengeben
Reagenz C:	50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B

##### Prüflösung:

100 µl Probe mit 2 ml Reagenz C gut mischen und 10 min stehen lassen.

100 µl Folin-Reagenz (Fa. Merck, Nr. 9001) zugeben, gut mischen und 30 min stehen lassen

100 µl Triton-X-100 (1%ig in dest. Wasser) zugeben.

Absorptionsbestimmung gegen Reagenz + Folin + Triton als Leerwert im Spektralphotometer (Beckman, Modell 34) - Wellenlänge: 660 nm

##### Eichlösung:

0,1 % BSA-Lsg.

10-50 µl = 10 - 50 µg BSA/Ansatz

#### **4.10.2.7 Präparation von humanen Low-Density-Lipoproteinen (LDL)**

Human-Vollblut der Blutbank Köln (Antikoagulan: Citrat) wird in einer Laborzentrifuge (Labofuge 6000, Heraeus) 15 min bei 3.00 Upm zentrifugiert. Der Überstand (Citrat-Plasma) wird mit Kaliumbromid (KBr, Merck, Nr. 4905) auf eine Dichte von 1,02 g/ml eingestellt und wie folgt zentrifugiert: Ultrazentrifuge L8-70M und 70 Ti-Rotor, Quickseal-Röhrchen, Fa. Beckman, 16 h, 65.000 Upm; die Trennung erfolgte bei 4 °C.

Es werden 10 ml Überstand (VLDL, Chylomikronen) mittels Pasteurpipette abgenommen und verworfen.

Die untere Phase wird mit KBr auf eine Dichte von 1,063 g/ml eingestellt und erneut unter oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Die oberen 5-8 ml (je nach LDL-Gehalt des Plasmas) werden mittels Pasteurpipette abgenommen und gegen folgenden Puffer dialysiert:

36,0 g Natriumchlorid (NaCl, Merck, Nr. 6404)  
1,5 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Sigma, Nr. ED2SS)  
1,2 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Sigma, Nr. S0876)

mit vorgekühltem (4 °C) bidest. Wasser auf 4 l aufgefüllt (pH 7,2). Der Dialysepuffer wird jeweils frisch angesetzt, wobei für 100 ml LDL-Präparation sechsmal 4 l Dialysepuffer eingesetzt werden; die Dialyse erfolgt über insgesamt 24 h. Es wird ein Dialyseschlauch mit einer Ausschlußgrenze von 10.000 g/mol (Serva, Nr. 44110) eingesetzt.

Nach einer Proteinbestimmung nach Lowry (s. 4.10.2.6) werden die LDL sterilfiltriert (Einwegfilterhalter, Sartorius, Nr. 16534 K); die maximale Haltbarkeit beträgt 4 Wochen.

#### **4.10.2.8 Radiojodierung von LDL**

1 ml LDL (Proteingehalt 2-3 mg/ml) werden mit 20 Jodobeads (Pierce Chemical Company, Nr. 28666) und 10  $\mu\text{l}$  (37 MBq)  $\text{Na}^{125}\text{J}$  (DuPont/NEN, Nr. NEZ033A) 20 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die LDL werden anschließend von den Jodobeads getrennt, 1:1 (v/v) mit eiskalter 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt und sechsmal gegen 1 l dieser

Lösung bei 4 °C dialysiert (24 h, Dialyseschlauch mit 10.000er Ausschlußgrenze, Serva, Nr. 44104). Die  $^{125}\text{J}$ -LDL werden nach einer Proteinbestimmung nach Lowry (4.10.2.6) und einer Bestimmung der eingebauten Radioaktivität im Gammazähler (LKB, Rackgamma II, Modell 1270) sterilfiltriert (Einwegfilterhalter, Sartorius, Nr. 16534 K) und bei 4 °C gelagert; die maximale Haltbarkeit beträgt 3 Tage! Die spezifische Aktivität der eingesetzten Präparationen lag im Bereich 200-300 cpm/ng Protein.

#### **4.10.2.9 Herstellung von acetylierten LDL**

1 ml LDL-Lösung (10-16 mg Protein/ml) und 1 ml kaltgesättigte Natriumacetatlösung werden im Eisbad gerührt, wobei darauf geachtet wird, daß die gesamte Lösung ständig in Bewegung ist.

Acetanhydrid wird langsam (etwa 3  $\mu\text{l}$ /5 min) zugetropft, wobei die benötigte Menge nach folgender Regel ermittelt wird:

$$\text{mg LDL-Protein} \times 1,5 = \mu\text{l Acetanhydrid.}$$

Nach Zugabe des gesamten Acetanhydrids wird die gesamte Lösung noch weitere 30 min gerührt.

Über Nacht wird gegen

0,9 % NaCl

0,3 mmol/l EDTA; pH 7,4, 4 °C

dreimal dialysiert.

Zur Kontrolle wird anschliessend eine Agarose-Elektrophorese durchgeführt. Bei erfolgreicher Acetylierung der LDL kann die Proteinbande der acetylierten LDL bei einem höheren  $R_f$ -Wert (etwa auf der Höhe der HDL) lokalisiert werden. Andernfalls schmiert die Bande vom Start an, was auf eine Denaturierung der LDL hinweist.

#### **4.10.2.10 HPTLC-Bestimmung von Cholesterin und Cholesterinester**

Die unter Stickstoffgasstrom getrockneten Extrakte aus Zellhomogenat werden in 30  $\mu\text{l}$  Chloroform aufgenommen und davon jeweils 0,5  $\mu\text{l}$  mit dem Nanomat (Fa. Camag) mittels 0,5  $\mu\text{l}$ -

Kapillaren auf HPTLC-Fertigplatten (Platten Kieselgel 60, 20 x 10 cm, Fa. Merck) in einem Abstand von 0,5 cm aufgetragen. Man läßt die HPTLC-Platten zuvor im Laufmittel n-Hexan, n-Heptan, Diethylether, Eisessig (63:18,5:18,5:1,5 v/v) zur Reinigung vorlaufen, anschliessend eine Stunde bei 100 °C aktivieren und vor Auftragen der Proben wieder auf Raumtemperatur abgekühlen.

Als Eichlösung wird eine Mischung aus Cholesterin, Cholesterinester und Cholesterinformiat in einem Bereich von 0,0125-0,2 µg aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt in einer Linear-kammer mit 4 ml Laufmittel (s.o.) für 10 min. Nach Trocknung der Platte für 10 min bei 100 °C werden die aufgetrennten Komponenten durch Eintauchen (10 sec) in unten aufgeführtem HPTLC-Tauchbad und Entwicklung im Trockenschrank für 20 min bei 105 °C sichtbar gemacht.

#### HPTLC-Tauchbad:

3,2 g	MnCl <sub>2</sub>
480	ml Methanol
480	ml Aqua dest.
32	ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> konz.

Nach Abkühlung der Platten wird die Masse der Komponenten durch Fluoreszenz-Densitometrie (Anregungswellenlänge 366 nm, Emissionswellenlänge 510 nm) mit einem Dünnschicht-Scanner (Fa. Camag) und Auswertung der Peak-Flächen mit dem Integrator SP 4100 (Spectra Physics) bestimmt.

#### *4.10.2.11 Bestimmung des Thiobarbitursäure-reaktiven*

##### *Materials in oxidativ modifizierten LDL*

#### *4.10.2.11.1 Durchführung der LDL-Modifizierung*

Eine Petrischale (Nunc, Nr. 150350) mit konfluenten Kaninchen-aortenzellen wird nach 4.10.2.4 auf eine Multischale (MS) mit 24 Vertiefungen (Nunc, Nr. 146485) gesplittet, und die Zellen werden in 0,5 ml DMEM/10 % FKS (pro MS-Vertiefung) 24 h inkubiert. Der Zellmonolayer wird einmal mit PBS gewaschen und weitere 24 h mit F10-Medium im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Das Medium wird anschliessend gegen frisches F10 unter Zusatz von 200 µg/ml LDL und Prüfsubstanzen (0,5 ml

Medium, 1 % Ethanol-Endkonzentration (v/v)) ausgetauscht und 24 h inkubiert. Sechs Kontrollinkubationen werden *ohne Substanzzusatz* zur Quantifizierung der maximalen oxidativen LDL-Modifizierung durchgeführt; zur Kontrolle, ob die eingesetzten Aortenzellen aktiv modifizieren, werden drei Kontrollinkubationsansätze *ohne Zellen* durchgeführt.

300 µl des Mediums werden für den TBA-Assay (s. 4.10.2.11.2) eingesetzt. Der Zellmonolayer wird sofort für die Bestimmung der Zellvitalität eingesetzt (s. 4.10.2.11.3).

#### 4.10.2.11.2 TBA-Assay

a) TBA-Reagenz:

1,0 g Thiobarbitursäure (Sigma, Nr. T5500)  
werden in 99 ml bidest. Wasser unter Erwärmen gelöst

b) Malondialdehyd-Standardkurve:

Tetraethoxypropan (Fa. Sigma, Nr. T9889) wird vor Gebrauch in F10-Medium gelöst. Zur Eichkurvenerstellung werden 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 und 10,0 nmol dieses Diacetals eingesetzt, wobei unter den Bedingungen des TBA-Assays eine äquimolare Menge Malondialdehyd entsteht.

c) TBA-Assay:

300 µl Medium (aus Zellversuch oder Standardmedium)  
+ 600 µl 25 %ige Trichloressigsäure (Merck, Nr. 807,  
Lösung in bidest. Wasser)  
+ 600 µl TBA-Reagenz  
werden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen im Wasserbad 45 min bei 95 °C inkubiert und - nach Abkühlung auf Raumtemperatur - 5 min bei 3000 Upm (Beckman, Microfuge 12) zentrifugiert. Die im Überstand verbleibenden Farbpigmente des Thiobarbitursäure-reaktiven Materials werden mittels fluorometrischer Bestimmung (Fluoroskan II, Flow, Anregung bei 515 nm, Emissionsmessung bei 555 nm) quantifiziert.

#### 4.10.2.11.3 Bestimmung der Zellvitalität (MTT-Test)

a) MTT-Reagenz:

1 mg 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Sigma, Nr. 2128) werden in 1 ml F10-Medium kurz vor Gebrauch gelöst.

b) MTT-Test:

Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und der Monolayer mit 0,5 ml MTT-Reagenz für 2 h bei 37 °C inkubiert. Das Reagenz wird anschliessend abgesaugt und die MTT-Umsetzung durch Zusatz einer 3 %igen SDS-Lösung (Natriumdodecylsulfat, Sigma L4509) und Isopropanol (mit 0,04 mol/l HCl) gestoppt.

Die Multischalen werden zur Solubilisierung des gebildeten Formazans 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Menge gebildeten Formazans wird durch Absorptionsmessung bei 570 nm in einem Spektralphotometer (Beckman, Modell 34) bestimmt.

#### **4.10.2.11.4 Auswertung**

Bestimmt wird die entstandene Menge Thiobarbitursäure-reaktiven Materials als Stoffmenge Malondialdehyd-äquivalenter Verbindungen bezogen auf die gebildete Formazanmenge bzw. bei einigen Untersuchungen auf die Zellproteinmenge. Die prozentuale Differenz des Mittelwertes von drei parallelen Ansätzen pro Substanz-Konzentration zum Mittelwert der Kontrollinkubationen (mit Aortenzellen) dient als Maß für die Inhibition der oxidativen Modifizierung der LDL.

#### **4.10.2.12 <sup>125</sup>J-LDL Degradationsstudien**

J774-Zellen werden nach 4.10.2.4 in Multischalen mit 24 Vertiefungen (24er MS) 20 h in 1 ml DMEM/10 % FKS/1 % L-Glutamin/1 % Natriumpyruvat kultiviert. Nach Ersatz des Mediums durch DMEM/ 0,1 % BSA wird weitere 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Auf die so vorbereiteten Makrophagen wird der mittels DMEM-Zusatz auf eine LDL-Konzentration von 10 µg/ml eingestellte Kulturüberstand von LDL-Modifizierungen (s. 4.10.2.11.1) gegeben, wobei der Proteinanteil der für die Modifizierung eingesetzten LDL radiojodiert ist (s. 4.10.2.8). Zur Korrektur der durch die Plastikoberfläche bewirkte LDL-Degradierung wird ein Parallelansatz ohne Zellen durchgeführt. Nach 5 h wird das Medium abgenommen, die Zellen werden in 0,5 ml 0,5 mol/l NaOH gelöst und 100 µl für eine Proteinbestimmung nach Lowry eingesetzt. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß werden 200 µl Medium mit 200 µl PBS/0,2 % BSA und 100 µl

60 %iger Trichloressigsäure (Merck, Nr. 807) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10minütiger Zentrifugation (Beckman, Microfuge 12) wird mit 100 µl 0,6 %iger Silbernitratlösung versetzt und 72 h (!) bei 4 °C inkubiert. Nach 10minütiger Zentrifugation (Beckman, Microfuge 12) wird aus 300 µl Überstand die Radioaktivität in einem Gammazähler (LKB Rackgamma II, Modell 1270) quantifiziert. Die durch J774-Zellen degradierten  $^{125}\text{J}$ -LDL werden durch Subtraktion der Radioaktivitätsdaten der Ansätze ohne Zellen von denjenigen mit J774-Zellen ermittelt. Nach Umrechnung der Radioaktivität in die Masse degradierter LDL wird dieser Parameter auf das jeweilige J774-Zellprotein relativiert.

#### **4.10.2.13 Makrophagenbeladung mit Aorten-Lipid-Protein-Komplexen**

##### **4.10.2.13.1 Präparation eines $^{14}\text{C}$ -Oleat/BSA-Komplexes:**

In 3 ml auf 60 °C temperierter 0,9 %iger NaCl-Lösung werden 38,7 mg Natriumoleat (Sigma, Nr. 07501) gelöst und nach Abkühlung auf 40 °C mit einer eiskalten Lösung von 1,2 g BSA in 5 ml 0,9 %iger NaCl, pH 7,4, tropfenweise (!) versetzt. Die Lösung wird sterilfiltriert und im Kühlraum bis zu drei Monaten gelagert.

Für Zelleexperimente wird jeweils frisch der  $^{14}\text{C}$ -Oleat/BSA-Komplex wie folgt angesetzt:

Pro Multischalen-Einheit werden 5 µl  $^{14}\text{C}$ -Ölsäure (DuPont, Nr. NEC317, 50 µCi/500 µl Ethanol) eingesetzt. Der Ethanol wird im Sovirell mit Stickstoff abgeblasen, die verbleibende  $^{14}\text{C}$ -Ölsäure in 16 µl (pro MS-Einheit) Albumin-Natriumoleat-Komplex aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Der so präparierte  $^{14}\text{C}$ -Oleat/BSA-Komplex wird maximal ein Tag bei 4 °C gelagert.

##### **4.10.2.13.2 Extraktion von Lipid-Protein-Komplexen aus Aorten**

Weißer Neuseeländer Kaninchen (2,0 - 2,5 kg) werden 3 Wochen mit einer Cholesterin-haltigen Diät (1 %ig) gefüttert (Tages-Futtermittelverbrauch ca. 200 g); die Plasmacholesterinwerte steigen im Verlauf dieser Fütterungsphase auf ca. 1000-1500 mg/dl.



Während der anschliessenden sechswöchigen Fütterung mit Kaninchen-Normalfutter sinken die Plasma-Cholesterinkonzentrationen in den Normalbereich (50 - 70 mg/dl). Nach der nun folgenden dreiwöchigen Behandlung mit 10 mg/kg bzw. 30 mg/kg Probucol (p.o.) wird den Tieren die Aorta entnommen, welche - nach Entfernung von adipösem Gewebe und Reinigung in eiskaltem PBS-Puffer - unter flüssigem Stickstoff zermörsert und lyophilisiert wird. 50 mg des Aortenpulvers werden 30 min mit folgendem Puffer (4 °C kalt, 0,5 ml) bei Raumtemperatur geschüttelt (in Eppendorf-Reaktionsgefäßen) :

0,05 mol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

0,005 mol/l EDTA (Titriplex III)

0,15 mol/l NaCl, pH=7,4 (mit 2 mol/l HCl einstellen).

Die Proben werden 3 min bei 12.000 Upm (Microfuge 12) zentrifugiert. Der Überstand wird im Kühlraum gelagert, das verbleibende Pellet insgesamt weitere dreimal mit 0,5 ml obigen Puffers bei 4 °C extrahiert. Die jeweiligen Überstände werden vereinigt und durch eine Ultrazentrifugation (Beckman TL100, 100.000 Upm, 15 min, TL100.2-Rotor, Quickseal-Röhrchen) von Schwebstoffen getrennt. Die Extrakte werden sterilfiltriert (Einmalfilterhalter, Sartorius, Nr. 16534K) und 50 µl für eine Proteinbestimmung nach Lowry eingesetzt.

#### **4.10.2.13.3 Makrophagenbeladung mit Aorten-Lipid-Protein-Komplexen**

J774 werden in 6er Multischalen (6er MS, NUNC, Nr. 150229) subkonfluent in 2 ml (pro MS-Einheit) DMEM/10 % FKS/1 % Glutamin (v/v), 1 % Natriumpyruvat (v/v) kultiviert. Nach 6 h wird das Kulturmedium gegen gleiches Medium, jedoch ohne FKS-Zusatz, gewechselt. Zum Entfernen von FKS-Reste werden die Zellen dabei mit PBS-Puffer gewaschen.

Nach einer 24stündigen Inkubation bei 37 °C im Brutschrank werden die Makrophagen mit 2 ml obigen Mediums unter Zusatz von 100 µg/ml Protein/Lipid-Komplexen 24 h im Brutschrank inkubiert, wobei für die letzten 4 h der Inkubation 16 µl  $^{14}\text{C}$ -Oleat/BSA-Komplex (s. 4.10.2.13.1) zugesetzt werden. Pro Extrakt werden dabei drei MS-Einheiten eingesetzt; Inkubationen ohne LDL, mit acetyliertem LDL bzw. nativem LDL

(jeweils 100 µg/ml) werden ebenfalls als Dreifachinkubation angesetzt.

Zur Aufarbeitung werden die Multischalen dreimal vorsichtig mit 2 ml PBS-Puffer gewaschen, die Zellen nach Zugabe von 500 µl PBS mittels Gummiwischer abgeschabt und in Sovirell-Reagenzgläser gegeben. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 2.000 Upm (Labofuge 6000, Heraeus) und Absaugen des Überstandes, wird das Zellpellet in 500 µl PBS-Puffer aufgenommen und zweimal 15 sec bei 30-40 W ultrabeschallt. 100 µl des Zellhomogenates dienen der Proteinbestimmung nach Lowry, 300 µl werden sofort in mit Chromschwefelsäure gespülte Sovirell-Reagenzgläser überführt und nach Zugabe von ca. 100.000 dpm <sup>3</sup>H-Cholesterinester (DuPont, Nr. NET746), 30 µl Cholesterinformat (0,4 mg/ml in Chloroform) und 1 ml bidest. Wasser zweimal mit 3 ml Chloroform:Methanol = 2:1 (Merck, Lichrosolv) extrahiert.

Die HPTLC-Bestimmung wird nach 4.10.2.10 durchgeführt.

Die Einbaurate von <sup>14</sup>C-Ölsäure in Cholesterinester wird wie folgt bestimmt:

Nach der HPTLC-Bestimmung wird die Restlösungsmittelmenge abgeblasen, der Rückstand erneut in 30 µl aufgenommen, auf Kieselgelplatten (Whatman LK5D) aufgetragen und mit n-Hexan/Diethylether/Eisessig = 85/15/1 (200 ml) 45 min entwickelt. Nach Lufttrocknung der Platten werden diese mittels β-Kamera (Fa. Berthold) photographiert, die radioaktiven Stellen markiert und die Cholesterinesterbereiche ausgekratzt. Die Einbaurate von <sup>14</sup>C-Ölsäure in CE wird nach Zugabe von 4 ml Szintillator (Packard, Instagel II) im Szintillationszähler (<sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C-Dual-Meßprogramm, LKB 1219-Zähler) bestimmt und auf das jeweilige Zellprotein bezogen.

#### **4.10.3 Ergebnisse und Diskussion**

Ein erstes Ziel der Untersuchungen im Projektzeitraum war, die Anwendbarkeit der Bestimmung der Endothelzell-vermittelten oxidativen Modifizierung von LDL mittels des Thiobarbitursäureassays, der den Gehalt an Malondialdehyd-ähnlichen Verbindungen in modifizierten LDL zu bestimmen erlaubt, für Rohextrakte aus unserer Pflanzenzellkultur (PZK) zu vali-

dieren. Tabelle 4.19 zeigt eine Auswahl der mit PZK-Extrakten gewonnenen Daten, welche verdeutlicht, daß ein großer Teil dieser heterogenen Fraktionen keinen oder einen nur minimalen inhibierenden Effekt ( $< 50\%$ ) auf die LDL-Modifizierung ausübt.

Auf diese Weise können aus einer Vielzahl von Rohextrakten einige wenige verfolgenswerte selektiert werden, wobei nach Auftrennung und Isolation der wirksamen Komponente(n) eine In-vitro-Prüfung erfolgen könnte, die die Untersuchung der Aufnahme der weniger modifizierten LDL-Partikel durch Makrophagen als Ziel hat.

Dieses Modell wurde in der Folgezeit intensiv untersucht. Abbildung 4.67 zeigt die konzentrationsabhängige inhibitorische Potenz von NAT 02-123 bei der oxidativen LDL-Modifizierung anhand der verminderten Entstehung von Thiobarbitursäure-reaktivem Material.

Diese modifizierten LDL wurden nach Rückgewinnung aus dem Kulturmedium mittels Ultrazentrifugation mit einer Makrophagen-Zelllinie (J774) inkubiert, wobei es zu den in Abb. 4.68 dargestellten Veränderungen im Lipidgehalt der Zellen kam, die im folgenden diskutiert werden sollen:

Anhand des mittels der HPTLC-Methode bestimmten Gesamtcholesterins kann gezeigt werden, daß Endothelzell-alterierte LDL zu einer ähnlich großen Lipidakkumulation in Makrophagen führen wie die durch Acetylierung modifizierten LDL. Dieses Ergebnis ist aufgrund der größenordnungsmäßig ähnlichen Erhöhung der elektrophoretischen Mobilität beider Fraktionen nicht überraschend. NAT 02-123 führt bei kleinen Konzentrationen, wie erwartet, zu einer Verminderung des Cholesteringehaltes der Makrophagen (versus Kontrolle mit Zellen), bewirkt jedoch bei  $10\text{ }\mu\text{mol/l}$  bzw.  $32\text{ }\mu\text{mol/l}$  eine erhöhte Aufnahme der modifizierten LDL und eine verstärkte zelluläre Lipidakkumulation. Vergleicht man TBA-Werte und Lipidgehalt der J774-Zellen unter Substanzeinfluß (Abb. 4.67 und Abb. 4.68), so wird ein inverser Zusammenhang deutlich, der durch eine kovalente Bindung der Substanz an z.B. freie SH-Gruppen des Apoproteinanteils (apoB) der LDL erklärt werden kann.

Tab. 4.19: LDL-Modifizierung durch Kaninchenaortenzellen.

Die Zellen wurden bei 37 °C für 24 h in serumfreiem F10-Medium, welches 1 % NEAA, FeSO<sub>4</sub> (c = 1 µmol/l) und CuSO<sub>4</sub> (c = 1 µmol/l) enthielt, vorinkubiert. Nach Zusatz von frischem Medium, welches zusätzlich 200 µmol/l LDL und die angegebenen Substanzen enthielt, wurde weitere 24 h inkubiert. Die Zellen wurden in 0,5 mol/l NaOH solubilisiert; ein 100-µl-Aliquot diente der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951). Aus den zuvor abgenommenen Medien wurde das Thiobarbitursäure-reaktive Material nach der Methode von Steinbrecher et al. (1984) bestimmt.

Substanz	Konzentration [µmol/l]	% versus Kontrolle
NAT 20-60611102	10,0	- 52,9
NAT 20-60611103	10,0	- 43,2
NAT 20-60311102	10,0	- 42,4
NAT 20-60311103	10,0	+ 20,6
NAT 20-52911103	10,0	- 8,5
NAT 20-52811102	10,0	- 15,7
NAT 20-52811103	10,0	- 4,0
NAT 20-66011102	10,0	- 71,3
NAT 20-66011103	10,0	- 20,6
NAT 20-64211102	10,0	- 40,6
NAT 20-64211103	10,0	- 5,2
NAT 20-64111102	10,0	- 44,8
NAT 20-64111103	10,0	+ 13,5
NAT 18-15711102	10,0	- 74,6
NAT 18-15711103	10,0	- 14,8
NAT 20-75111102	10,0	- 5,9
NAT 20-75111103	10,0	+ 11,7
NAT 18-04811102	10,0	- 0,4
NAT 18-04811103	10,0	+ 3,7
NAT 18-32811102	10,0	+ 11,0
NAT 18-17611102	10,0	- 64,1
NAT 18-17611103	10,0	- 3,4
NAT 18-45211102	10,0	- 26,9
NAT 18-19511102	10,0	- 15,7
NAT 18-19511103	10,0	+ 22,3
NAT 18-08811102	10,0	+ 5,3
NAT 18-08811103	10,0	- 33,4
NAT 18-35811102	10,0	+ 4,5

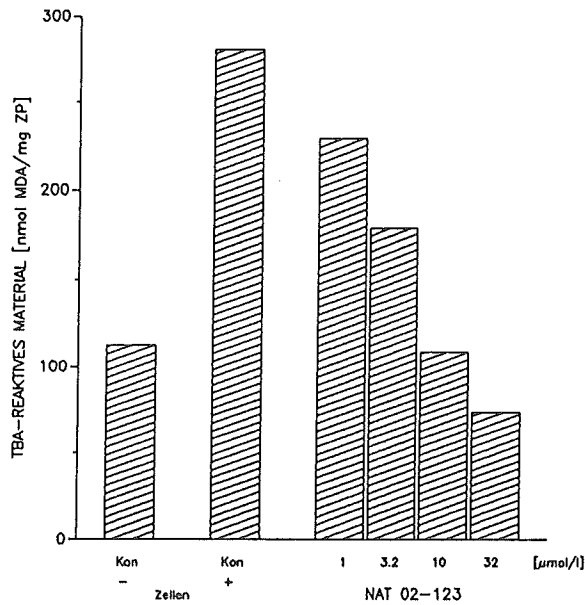


Abb. 4.67: Einfluß von NAT 02-123 auf die oxidative LDL-Modifizierung durch Kaninchenaortenzellen. Die Zellen wurden bei 37 °C für 24 h in serumfreiem F10-Medium, welches 1 % NEAA und  $\text{CuSO}_4$  ( $c=1 \mu\text{mol/l}$ ) enthielt, vorinkubiert. Nach Zusatz von frischem Medium, welches zusätzlich 200  $\mu\text{mol/l}$  LDL und NAT 02-123 in den angegebenen Konzentrationen enthielt, wurde weitere 24 h inkubiert. Die Zellen wurden in 0,5 mol/l NaOH solubilisiert; ein 100- $\mu\text{l}$ -Aliquot diente der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951). Aus den zuvor abgenommenen Medien wurde das Thiobarbitursäure-reaktive Material nach der Methode von Steinbrecher et al. (1984) bestimmt.  
ZP = Zellprotein

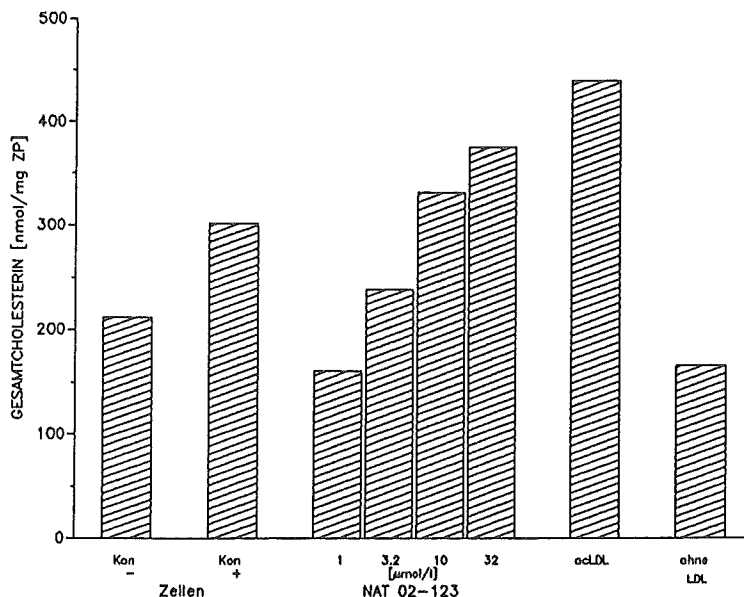


Abb. 4.68: Internalisation von durch Kaninchenaortenzellen modifizierten LDL (in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von NAT 04-123) durch die Makrophagen-ähnliche Zelllinie J774.

Die LDL-Modifizierung wurde, wie in der Legende zur Abb. 4.67 beschrieben, durchgeführt.

Nach der Inkubation wurden die modifizierten LDL mittels Ultrazentrifugation (Modell TL 100, Beckman Instruments) reisoliert. Für die Degradationsexperimente wurden J774-Monolayer mit DMEM/ 0,1 % BSA für 16 h bei 37 °C in einem CO<sub>2</sub>-begasteten Brutschrank inkubiert. Nach Zusatz von frischem Medium, welches 100 µg/ml der reisolierten LDL enthielt, wurde für weitere 18 h inkubiert. Kontrollinkubationen wurden mit 100 µg/ml acetylierten LDL durchgeführt.

Die Zellen wurden anschliessend abgekratzt, mit PBS-Puffer, pH 7,4, gewaschen und mittels Ultrabeschallung homogenisiert. Protein wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Cholesterin wurde mittels HPTLC nach der Methode von Halpaap (1978) bestimmt.

Angegeben sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen.

ZP = Zellprotein

Verifiziert werden konnten diese Ergebnisse durch Degradationsuntersuchungen von modifizierten LDL im Makrophagensystem. Als Parameter dient der Mediumgehalt an durch Aufnahme und Abbau der LDL in J774-Zellen entstandenen Bruchstücken des apoB, welcher bei Inkubation mit modifizierten LDL deutlich erhöht ist. Abb. 4.69A zeigt die inhibitorische Potenz bezüglich der LDL-Modifizierung durch eine strukturverwandte Verbindung des NAT 02-123, das Ebselen. Die Bestimmung der

Degradationsrate (Abb. 4.69B) macht deutlich, daß mit zunehmender Ebselen-Konzentration zwar die oxidative Modifizierung der Lipoproteine (TBA-Assay) vermindert, die Aufnahme in J774-Zellen und der Abbau jedoch gesteigert werden.

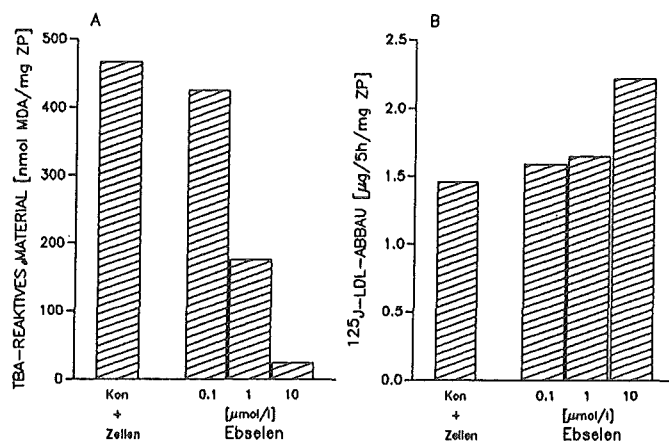


Abb. 4.69: (A) Oxidative LDL-Modifizierung (in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Ebselen) durch Kaninchen-aortenzellen.

Die Inkubationen wurden, wie in der Legende zu Abb. 4.67 beschrieben, mit der Ausnahme durchgeführt, daß <sup>125</sup>J-markierte LDL (mit nicht-markierten LDL auf eine spez. Akt. von ca. 10 cpm/ng eingestellt) eingesetzt wurden.

(B) Degradation der oxidativ modifizierten LDL durch J774-Zellen.

J774-Zellen wurden in DMEM/0,1 % BSA für 20 h bei 37 °C in einem CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank inkubiert. Die zuvor durch Aortenzellen modifizierten <sup>125</sup>J-LDL wurden 5 h mit den J774-Zellen inkubiert. Die Menge an jodidfreien, Trichloressigsäure-löslichen Degradationsprodukten wurde anschliessend aus den Medien nach Henriksen et al. (1981) bestimmt.

ZP = Zellprotein

Untersuchungen mit Substanzen anderer Strukturklassen zeigten, daß die beschriebene Diskrepanz zwischen der Inhibition der oxidativen Modifizierung von LDL einerseits und der Degradation der mit Substanz "behandelten" LDL andererseits häufig auftritt. Da sich der zuletzt genannte In-vitro-Test

zusätzlich als schlecht reproduzierbar erwies, wurde dieser methodische Approach nicht weiter verfolgt.



**Tab. 4.20: Einfluß von Referenz- und Prüfsubstanzen auf die oxidative LDL-Modifizierung durch Kaninchenaortenzellen und Enzymaktivitäten des Arachidonsäure-Metabolismus.**

Die Zellen wurden bei 37 °C für 24 h in serumfreiem F10-Medium, welches 1 % NEAA,  $\text{FeSO}_4$  ( $c = 1 \mu\text{mol/l}$ ) und  $\text{CuSO}_4$  ( $c = 1 \mu\text{mol/l}$ ) enthielt, vorinkubiert.

Nach Zusatz von frischem Medium, welches zusätzlich 200  $\mu\text{mol/l}$  LDL und die angegebenen Substanzen enthielt, wurde weitere 24 h inkubiert.

Die Zellen wurden in 0,5 mol/l NaOH solubilisiert; ein 100- $\mu\text{l}$ -Aliquot diente der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951). Aus den zuvor abgenommenen Medien wurde das Thiobarbitursäure-reaktive Material nach der Methode von Steinbrecher et al. (1984) bestimmt.

Der Einfluß von 100  $\mu\text{mol/l}$  der angegebenen Substanzen auf Enzyme des Arachidonsäuremetabolismus wurde nach Standardmethoden, wie sie in Kapitel 2.12-2.15 beschrieben sind, bestimmt.

Abkürzungen:

5-LO: 5-Lipoxygenase

12-LO: 12-Lipoxygenase

CO: Cyclooxygenase

TXS: Thromboxansynthetase

TBARS: Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen

Substanz	% Inhibition				
	5-LO	12-LO	CO	TXS	TBARS
NAT 04-533	- 42,7	+ 203,8	- 83,8	- 93,3	- 18,2
NAT 06-209	n.b.	+ 224,5	- 85,8	- 100	- 25,1
Probucol	- 33,9	+ 37,8	- 57,3	- 63	- 69,8
Ebselen	- 100	- 100	- 100	- 100	- 92,7
$\alpha$ -Tocopherol	- 8,0	- 10,7	- 5,4	+ 2,7	- 13,0
BHT	- 76,5	+ 156,2	- 70,6	- 77,0	- 84,2
Indometacin	n.b.	+ 311,1	- 100	- 100	+ 13,7
NAT 02-678	- 89,8	+ 20,6	- 23,5	- 37,2	+ 9,1
NAT 01-606	- 100	- 100	- 100	- 100	- 82,8
NAT 04-501	- 40,1	+ 25,4	+ 28,6	+ 22,9	+ 14,1
NAT 04-477	n.b.	+ 371,1	- 93,1	- 100	- 20,7
NAT 06-025	- 100	- 77,6	- 25,9	- 100	- 82,8
NAT 02-677	+ 10,7	- 100	+ 22,4	- 43,5	- 89,0
NAT 02-755	- 12,8	+ 52,1	- 43,5	- 53,7	- 0,5
NAT 04-159	- 8,1	- 25,3	- 11,9	- 9,7	- 4,7
NAT 06-103	+ 6,7	+ 92,7	- 59,7	- 81,3	- 79,0
NAT 06-032	+ 3,5	+ 11,3	+ 3,7	- 8,0	+ 6,0
NAT 06-099	- 2,9	+ 56,5	- 67,2	- 82,2	- 66,0
Rosmarin-säure	- 0,9	+ 29,2	+ 12,4	+ 26,3	- 68,0
Kaffee-säure	- 17,0	- 25,4	+ 21,2	+ 59,7	75,0
Elemon-säure	+ 21,5	+ 170,7	- 34,9	- 21,3	+ 17,2
Podoverin A	- 100	- 100	- 94,9	- 94,9	- 84,0
B	- 94,9	- 95,9	- 96,9	- 98,6	- 72,0
C	- 100	- 94,7	- 100	- 100	- 73,0
NDGA	- 78,9	- 100	- 100	- 100	- 87,0
Quercetin	- 90,5	- 100	- 97,8	- 100	- 72,0

n.b. = nicht bestimmt

Um Anhaltspunkte für den Mechanismus der Inhibition der Lipidperoxidation zu finden, wurden die im Thiobarbitursäure-Assay erzielten Ergebnisse mit der Inhibitionswirkung der Substanzen auf einige Enzyme des Arachidonsäuremetabolismus verglichen (Tab. 4.20; Abb. 4.70-4.73). Die Auswertung zeigte, daß nur zwischen Inhibition der 12-Lipoxygenase und der Hemmung der Lipidperoxidation ein signifikanter Zusammenhang besteht ( $r = 0,4948$ ,  $p \leq 0,05$ , Abb. 4.71).

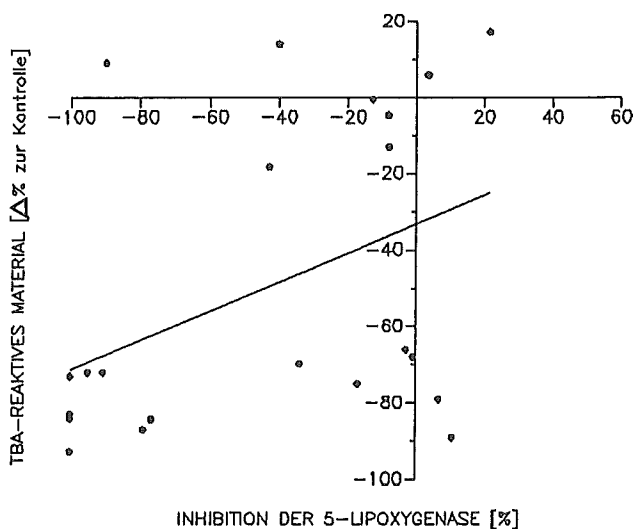


Abb. 4.70: Korrelation der Effekte der Testsubstanzen auf die Bildung Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen mit denen auf die 5-Lipoxygenase in Schweineleukozyten. Der Korrelationskoeffizient errechnete sich zu  $r = 0,363$ .

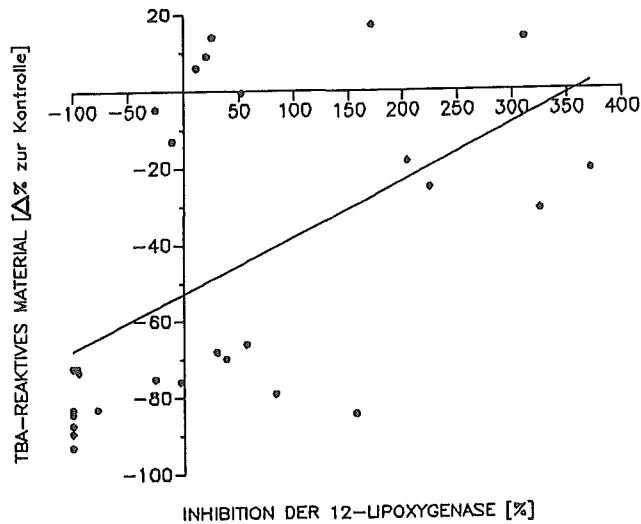


Abb. 4.71: Korrelation der Effekte der Testsubstanzen auf die Bildung Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen mit denen auf die 12-Lipoxygenase in Schweineleukozyten. Der Korrelationskoeffizient errechnete sich zu  $r = 0,4948$  ( $n=28$ ,  $p \leq 0,05$ ).

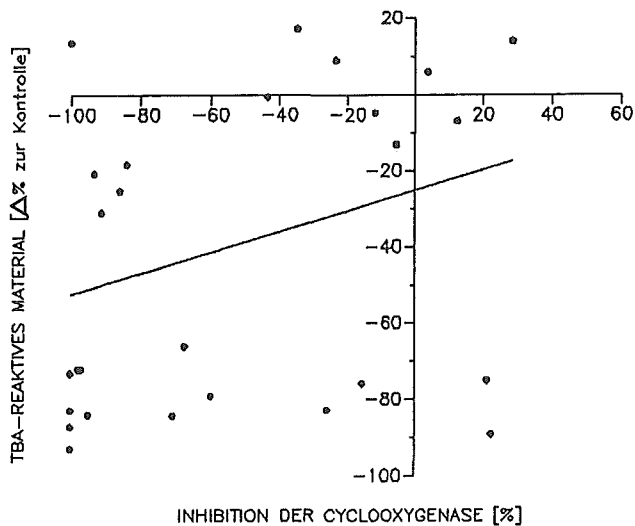
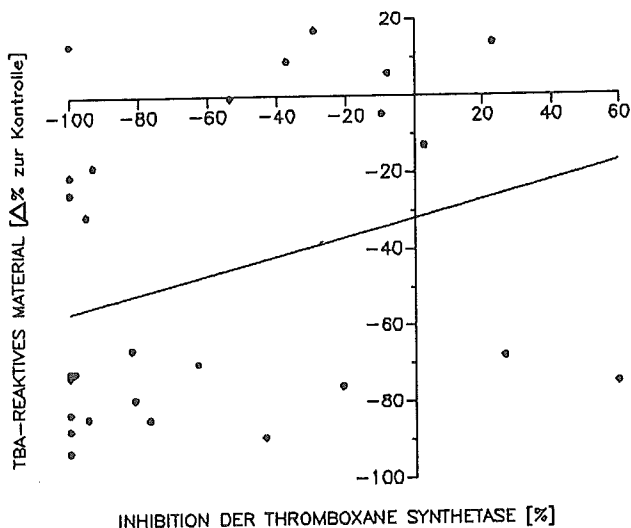


Abb. 4.72: Korrelation der Effekte der Testsubstanzen auf die Bildung Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen mit denen auf die Cyclooxygenase in humanen Thrombozyten. Der Korrelationskoeffizient errechnete sich zu  $r = 0,2212$ .



**Abb. 4.73:** Korrelation der Effekte der Testsubstanzen auf die Bildung Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen mit denen auf die Thromboxansynthetase. Der Korrelationskoeffizient errechnete sich zu  $r = 0,1105$ .

Andere, nicht weiter aufgeführte Versuche zeigten, daß zur zellvermittelten Modifizierung neben den "Kofaktoren"  $\text{Cu}^{2+}$  bzw.  $\text{Fe}^{2+}$  intakte Zellen notwendig sind. So konnte nach Zerstörung der Zellmembranen durch Ultrabeschallung (15 sec bei 30 W) oder Denaturierung durch einstündige Inkubation bei  $56^\circ\text{C}$  keinen zellabhängigen LDL-Modifizierung mit dem Thiobarbitursäureassay nachgewiesen werden.

Die oxidative Modifizierung von LDL, welche nach vierstündiger Vorinkubation von Humanplasma mit potenten Inhibitoren aus diesem durch Ultrazentrifugation isoliert wurde, läßt den Schluß zuzeigte, daß die eingesetzten in etwa äquipotenten Inhibitoren unterschiedlich starke Affinitäten zur LDL-Fraktion besitzen (Tab. 4.21). Wiederholte Experimente zeigten jedoch, daß das Ausmaß der Inhibition in Abhängigkeit verschiedener Plasmaspender bzw. Plasmalipidkonzentrationen stark schwankte, so daß eine Überprüfung durch Paralleluntersuchungen mit einer Referenzsubstanz (z.B. Probucol) notwendig ist. Da Substanzen mit selektiver Affinität zu LDL für den verfolgten therapeutischen Approach wünschenswert sind, können diese Untersuchungen wichtige Informationen über das In-vivo-Verhalten der Wirkstoffe ohne Tierverbrauch liefern.

**Tab. 4.21: LDL-Modifizierung durch Kaninchenaortenzellen.**  
*Humanes Citratplasma wurde mit den Prüfsubstanzen (10 µmol/l) für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die LDL wurden mittels Ultrazentrifugation nach der Methode von Havel et al. (1955) präpariert und gegen PBS-Puffer dialysiert. Die oxidative Modifizierung der LDL wurde, wie in der Legende zur Tab. 4.20 beschrieben, durchgeführt. Der Grad der oxidativen Modifizierung wurde in nmol Malondialdehyd-äquivalenten Materials (TBARS) bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen ± Standardabweichung.*

Substanz	TBARS	Veränderung gegenüber Kontrolle
	[nmol]	[%]
Kontrolle	2,28 ± 0,70	0
RP 51013	0,64 ± 0,11	- 72
RP 64777	1,63 ± 0,60	- 29
RP 7465	2,47 ± 0,60	+ 8
Probucol	0,58 ± 0,13	- 75

Ein wesentliches Problem bei der Untersuchung der Inhibition der oxidativen Modifizierung von LDL ist der fehlende In-vivo-Parameter zur Verifizierung der in vitro gewonnenen Ergebnisse. Bedingt durch die kurze Verweilzeit der effizient metabolisierten modifizierten Lipoproteinkomplexe im Plasma ist eine direkte Bestimmung z.B. der Lipidhydroperoxide (Miyazawa, 1989) ein wenig aussagekräftiger Parameter, der nur unvollständig das tatsächliche Ausmaß der oxidativen Destruktion im Plasma widerspiegelt. Gleiche Argumentation gilt für den Nachweis der plasmaständigen, modifizierten LDL mittels Antikörpern gegen chemisch modifizierte LDL (Zawadzki et al., 1989). Eine Möglichkeit der indirekten Quantifizierung könnten die von der Arbeitsgruppe um Palinski (1989) in Kaninchen und Mensch nachgewiesenen Autoantikörper gegen in vivo modifizierte LDL darstellen, da hier unter pathologischen Zuständen gleichbleibende Titer zu erwarten sind.

Im Tierexperiment bietet sich die Möglichkeit des direkten Nachweises modifizierter LDL in atheromatösen Plaques an, wie

dies immunologisch durch Haberland et al. (1988) am WHHL-Kaninchen demonstriert wurde. Die Extraktion der abgelagerten modifizierten Lipoproteinkomplexe aus Aortenmaterial und die anschliessende Beladung von Makrophagen mit diesen Komplexen (Morton et al., 1986) liefert indirekte Aussagen zum Ausmaß der Modifizierung von LDL.

Letztere Experimente wurden bei uns durchgeführt. Kaninchen wurden zur Bildung atheromatöser Plaques 3 Wochen mit Cholesterindiät behandelt. Nach sechswöchiger Normalfütterung und Absinken des Plasmacholesterins auf Normalwerte, wurden die Tiere 3 Wochen mit einem literaturbekannten Hemmer der Lipidperoxidation, Probucol (Fa. Merrell Dow), behandelt. Die anschliessend aus den Aorten extrahierten Lipid-Protein-Komplexe wurden zur Beladung der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie J774 eingesetzt, wobei die unter Cholesterinbelastung stimulierte Veresterungsrate (ACAT-Aktivität) als Meßparameter diente. Abb. 4.74 zeigt, daß die aus Kontrolltieren extrahierten Lipid-Protein-Komplexe die ACAT-Aktivität deutlich stimulieren, wenn auch nicht im selben Ausmaß wie chemisch modifizierte LDL. Die aus Probucol-behandelten Tieren gewonnenen Extrakte zeigten hingegen im Vergleich zur Kontrollinkubation keine zusätzliche Veresterung von Cholesterin; modifizierte Lipidfraktionen wurden in diesen Tieren offensichtlich nicht in der Aortenwand abgelagert.

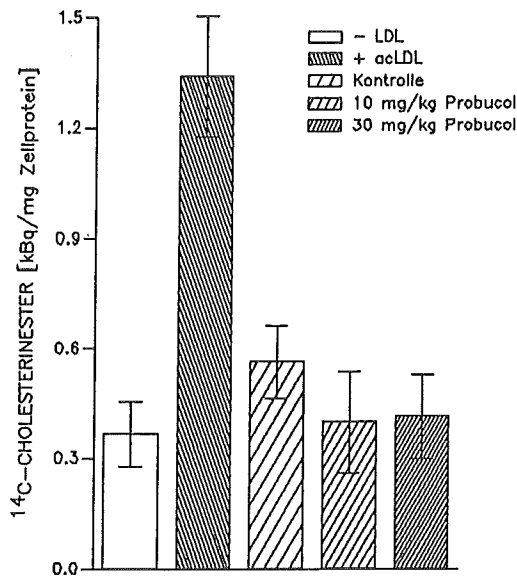


Abb. 4.74: Stimulation der Cholesterinesterbildung in J774-Zellen durch Lipoproteinkomplexe aus Aorten. Die Isolation der Lipoproteine aus Aortengewebe erfolgte nach Morton et al., 1986. J774-Zellen wurden in DMEM/ 0,1 % BSA/ 1 % NEAA mit 100 µg/ml (Protein nach Lowry, 1951) Aorten-Lipoproteinen bzw. acetylierten LDL für 24 h bei 37 °C in einem CO<sub>2</sub>-begasteten Brutschrank inkubiert. Während der letzten 4 h dieser Inkubationsphase wurden 0,2 mmol/l <sup>14</sup>C-Oleat (9,25 kBq/ml Medium), gebunden an BSA, zugesetzt. Zur Bestimmung der ACAT-Aktivität wurden die Zellen abgeschabt und die Radioaktivität nach Chloroform/Methanol-Extraktion, dünnschicht-chromatographischer Auftrennung der Cholesterin-esterfraktion und Auskratzen der entsprechenden radioaktiven Kieselgelzonen im Flüssigszintillationszähler quantifiziert. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen.

Wenn auch bisher nur die Referenzsubstanz Probucol in diesem therapeutischen Approach mit letzter Konsequenz untersucht wurde, zeigen die präsentierten Ergebnisse doch, daß mit Hilfe der In-vitro-LDL-Modifizierung eine Substanzauswahl ohne Tierversuch getroffen werden kann und daß - vor allem unter Hinzuziehung der unter Kapitel 4.11 vorgestellten Modelle - nur mechanistisch untersuchte Wirkstrukturen zur endgültig notwendigen Untersuchung im Tier eingesetzt werden. Eine Einsparung des Tierversuchs von über 90 % ist aufgrund der vorliegenden Screeningverfahren mit diesem Approach realistisch!

#### **4.11 Hemmung der oxidativen Modifizierung von Membranphospholipiden**

##### **4.11.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Um die Wirkung von Substanzen auf die Phospholipid-Oxidation in Zellmembranen zu messen, werden Schweinegranulozyten in Gegenwart der Testsubstanzen inkubiert, die Zellen werden aufgeschlossen und die Zellmembranen isoliert und extensiv gewaschen. Nach Oxidation mit Linolsäure-Hydroperoxid werden die Phospholipid-Hydroperoxide aus den Membranfragmenten extrahiert und mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie in Verbindung mit einer für Hydroperoxide selektiven Nachweismethode analysiert.

Substanzen, die die Oxidation von Membran-Phospholipiden verhindern, können die Cytotoxizität oxidierten LDL auf die Endothelzellen verhindern und damit potentiell antiatherogen wirksam sein. Voraussetzung für die Wirksamkeit ist nicht nur eine potentiell antioxidative bzw. membranstabilisierende Wirkung der Testsubstanzen, sondern auch eine ausreichend hohe Affinität zu den Membran-Phospholipiden.

##### **4.11.2 Material und Methoden**

###### **4.11.2.1 Reagenzien**

Linolsäure (99 % rein), Sojabohnenlipoxygenase,  $\beta$ -(Pyren-1-yl)hexanoyl- $\alpha$ -palmitoyl-phosphatidylcholin (interner Standard) und  $\alpha$ -Tocopherol-succinat sind von Sigma (München).

Alle weiteren benutzten Chemikalien haben p.a.-Qualitäten.

Die Substanzen werden in Ethanol (Stammlösung 1 mmol/l) und bei einer Endkonzentration von 10  $\mu$ mol/l geprüft.

Als Referenzsubstanz wird Probucol eingesetzt.



#### 4.11.2.2 Puffer und Lösungen

1. NaCl-Lösung (0,95 % w/w) mit 3,8 % (w/w) Na-Citrat und Liquemin (50.000 Units/l, Hoffmann-LaRoche, Grenzach-Wyhlen)
2. NaCl-Lösung (0,95 %, w/w) mit 6 % (w/w) Dextran T-500 (Pharmacia, Freiburg)
3. HBSS-Puffer (Tris/HCl, 14,5 mmol/l, pH 7,6; 0,1 % wasserfreie D-Glucose, w/w, 5 µmol/l  $\text{CaCl}_2$ , 98 µmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 0,54 mmol/l KCl, 0,14 mol/l NaCl) mit 0,38 % (w/w) Na-Citrat
4. Tris/HCl-Puffer (17 mmol/l, pH 7,2) mit 0,17 % (w/w)  $\text{NH}_4\text{Cl}$
5. Phosphat-Puffer (10 mmol/l, pH 7,4) mit 0,95 % (w/w) NaCl
6. Mikroperoxidase (25 mg) und Isoluminol (177,2 mg) werden in 300 ml Boratpuffer (0,1 mol/l, pH 10,0) gelöst und mit aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.
7. Linolsäurehydroperoxid-Lösung: Auf 12 x 2,5 ml Tris/HCl-Puffer (1 mol/l, pH 8,0) werden jeweils 100 µl Lipoxygenaselösung (1 mg/ml Tris/HCl-Puffer) und 100 µl Linolsäurelösung (5 mg/ml Tris/HCl-Puffer) gegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation wird mit jeweils 500 µl Ameisensäure (1 %) gestoppt; es wird mit 5 ml Chloroform/Methanol (1:1, v/v) extrahiert, die gepoolten organischen Phasen werden am Rotationsverdampfer eingedampft und in 200 µl Ethanol gelöst.

#### 4.11.2.3 Isolierung der Schweinegranulozyten

Das Schweineblut zur Isolierung der Granulozyten wird frisch geschlachteten Hausschweinen auf dem Schlachthof entnommen. Das Blut (1,8 l) wird in einem 2-l-Kunststoffgefäß aufgefangen und mit 200 ml Lösung 1 vermischt. Zur nachfolgenden Sedimentation der Erythrozyten wird das Blut (2 l) innerhalb 1 h in einem Kunststoff-Meßzylinder zu 400 ml Lösung 2 gegeben. Die Sedimentation und alle weiteren Schritte der Zellisolierung erfolgen bei Raumtemperatur. Nach 1 h Sedimentationsdauer wird der Überstand vorsichtig von den sedimentierten Erythrozyten getrennt und 10 min bei 500 x g zentrifugiert. Nach der ersten Zentrifugation befindet sich der größte Teil der Thrombozyten im Überstand. Das Sediment enthält Granulozyten, wenige Monozyten und die restlichen Erythrozyten. Der Überstand wird verworfen, das Pellet vorsichtig in Lösung 3

suspendiert und erneut zentrifugiert. Danach erfolgt die Lysis der restlichen Erythrozyten durch osmotischen Schock in 200 ml Lösung 4 (Inkubationsdauer: 5 min). Nach einer erneuten Zentrifugation werden die Zellen in Lösung 2 suspendiert, zentrifugiert und noch zweimal mit Lösung 5 gewaschen. Der Zelltitert wird mit Hilfe eines Coulter Counter (Coulter Electronics Ltd., Harpenden Herts, England) bestimmt und mit Lösung 5 auf  $1 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt. Mit Hilfe der Trypanblau-Vitalfärbung (1,8 ml Trypanblau-Lösung, Boehringer, Mannheim, + 3,0 ml Lösung 6 + 0,2 ml Zellsuspension) wird die Vitalität der Zellen überprüft (Thoma-Zählkammer, Brand, Wertheim). Der prozentuale Anteil vitaler Zellen sollte größer als 95 % sein. Die Granulozyten-Suspension wird unter leichtem Rühren (Magnetrührer) bei 4 °C maximal 14 h bis zur Inkubation aufbewahrt.

#### *4.11.2.4 Inkubation der Zellen mit der Prüfsubstanz*

Die Inkubation der Schweinegranulozyten (50 ml Zellsuspension) mit der Testsubstanz findet bei Raumtemperatur in einem Kunststoffbecherglas unter leichtem Rühren statt. Die Testsubstanz (in 100 µl Ethanol, Endkonzentration 10 µmol/l) wird 1 h mit den Granulozyten inkubiert. Danach werden 100 µl  $\alpha$ -Tocopherol-Succinatlösung (gelöst in Ethanol, Endkonzentration 300 µmol/l) dazugegeben und eine weitere Stunde inkubiert. Dies führt zu einer reproduzierbaren Sättigung der Membranen mit  $\alpha$ -Tocopherol. Nach Ende der Inkubation werden die Zellen abzentrifugiert (6.000 x g, 10 min) und in 20 ml 1:7 mit aqua dest. verdünnter Lösung 2 suspendiert.

#### *4.11.2.5 Isolation und Inkubation der Membranen mit Linolsäure-Hydroperoxidlösung*

Die Zellen werden ultrabeschallt (2 x 1 min, 30 W) und die Zellmembranfragmente bei 52.000 x g (10 min) abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit Lösung 2 werden die Membranen in 6 ml Lösung 2 suspendiert. Jeweils 2 ml davon werden 1 h mit 20 µl Linolsäure-Hydroperoxidlösung (siehe 4.11.2.2.) inkubiert.

#### 4.11.2.6 Extraktion und HPLC-Analyse

Die Inkubationen werden durch Zugabe von 5 ml Ethylacetat und 5 ml Chloroform/Methanol (2:1) gestoppt. Zur quantitativen Analyse der Phospholipid-Hydroperoxide werden den Inkubationslösungen 15 µl der internen Standardlösung zugesetzt (Standardlösung = 1 mg  $\beta$ -(Pyren-1-yl)Hexanoyl- $\alpha$ -Palmitoyl-Phosphatidylcholin/ml Methanol). Die organische Phase wird entnommen und am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wird in 200 µl Methanol gelöst und auf eine C18-Bond-Elut-Säule (ICT, Frankfurt) gegeben. Die Linolsäurehydroperoxidfraktion wird mit 10 ml Methanol/Wasser (75 : 25, v/v) von der Phospholipidfraktion getrennt; die Phospholipide werden mit 10 ml Methanol eluiert, am Rotationsverdampfer eingedampft, im Laufmittel (100 µl) gelöst und direkt in das HPLC-System injiziert.

##### HPLC-Analyse:

Säule: Novapak, C18  
125 mm x 4 mm (Waters, Eschborn)

Laufmittel: isokratisch  
Methanol/Wasser/Triethylamin  
(965 : 35 : 1, v/v)  
das Laufmittel wird mit Essigsäure auf pH 7,0  
eingestellt

Flußrate: 1 ml/min

Detektionswellenlänge: 340 nm

Chemilumineszenzdetektor: Kratos, FS 970 (Weiterstadt)

Nach der Trennung im HPLC und Durchfluß durch den UV-Detektor wird dem Laufmittel über ein T-Stück eine Isoluminol-Mikroperoxidase-Lösung (siehe 4.11.2.2.) zugesetzt (2,4 ml/min) und die durch die Reaktion dieser Lösung mit den Phospholipid-Hydroperoxiden entstehende Chemilumineszenz im Chemilumineszenz-Detektor analysiert.

#### 4.11.2.7 Auswertung

Die Substanzwirkung wird in % Hemmung oder % Aktivierung gegenüber einer Kontrollinkubation ohne Prüfsubstanz ausgedrückt. Der Wert läßt sich mit Hilfe des Flächenintegrals unter den Chemilumineszenz-Peaks unter Berücksichtigung der Fläche des internen Standards (UV-Peak bei 340 nm) berechnen.

#### 4.11.3 Ergebnisse und Diskussion

Wie aus Abbildung 4.75, einem Flußdiagramm dieser Methode, sichtbar wird, werden die Membranen nach Inkubation mit den Prüfsubstanzen extensiv gewaschen, so daß in diesem Testmodell nur solche Substanzen wirken können, die sich während der Inkubation mit den intakten Zellen in die Zellmembran integrieren lassen und während der nachfolgenden Waschschritte nicht aus den Membranen ausgewaschen werden. Abbildung 4.76 zeigt ein typisches Screeningergebnis, welches mit BW 755C erhalten wurde. BW 755C erwies sich in diesem Testmodell als wirksam.

Tabelle 4.22 zeigt die  $IC_{50}$ -Werte von Probucol und einiger anderer Referenzsubstanzen. Bei Probucol handelt es sich um einen auf den Markt befindlichen Lipidsenker, dessen antiatherosklerotische Eigenschaften möglicherweise auf der Hemmung der oxidativen Modifizierung von LDL beruhen. Die Prüfung im Modell "Hemmung der oxidativen Modifizierung von Membranphospholipiden" ergab, daß Probucol eine gute Affinität zu den Membranphospholipiden aufweist und - möglicherweise über eine Membranstabilisierung - die Oxidation mittels Linolsäure-Hydroperoxid verhindert.

Wir nehmen an, daß Substanzen, die den Phospholipidanteil der Lipoproteine wirksam vor oxidativer Modifizierung schützen können, auch die Oxidation von Phospholipiden in den Zellmembranen inhibieren sollten. Dieses Testmodell, welches Aussagen über die Hemmwirkung einer Substanz auf den Prozeß der Lipid-Peroxidation und über die Affinität zu biologischen Membranen zuläßt, wurde daher als Folgemodell für Substanzen entwickelt, welche sich in dem Testmodell "zellvermittelte oxidative Modifizierung von LDL" (Kap. 4.10) als besonders aktiv herausgestellt hatten. Von den 950 Substanzen, welche

dieses Testmodell durchlaufen hatten, wurden die 45 wirksamsten Substanzen auf die Hemmung der Oxidation von Membranphospholipiden geprüft. Nur fünf Substanzen waren in diesem Testmodell deutlich aktiver als Probucol und wurden damit für eine Evaluierung der In-vivo-Wirksamkeit als interessant genug befunden. Über 99 % der Substanzen brauchten also nicht tierexperimentell untersucht werden !

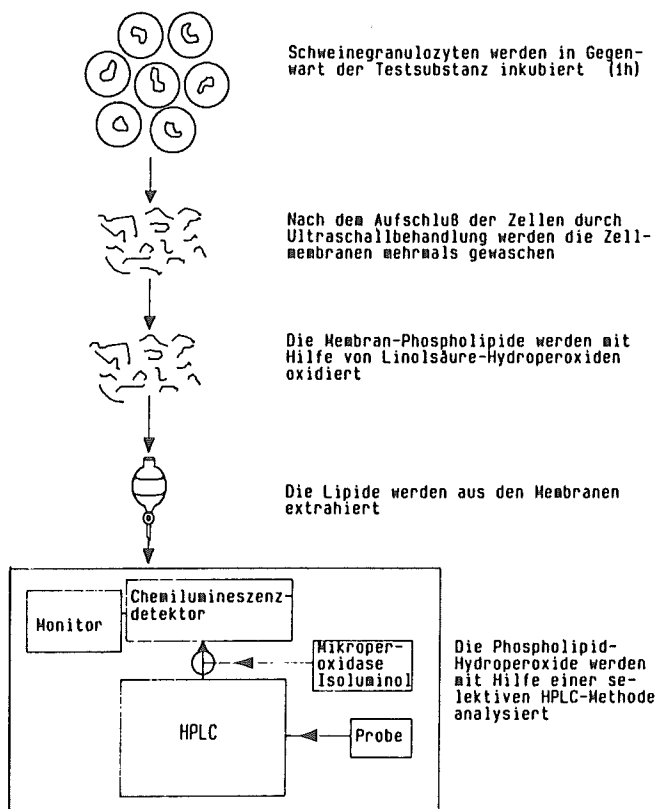
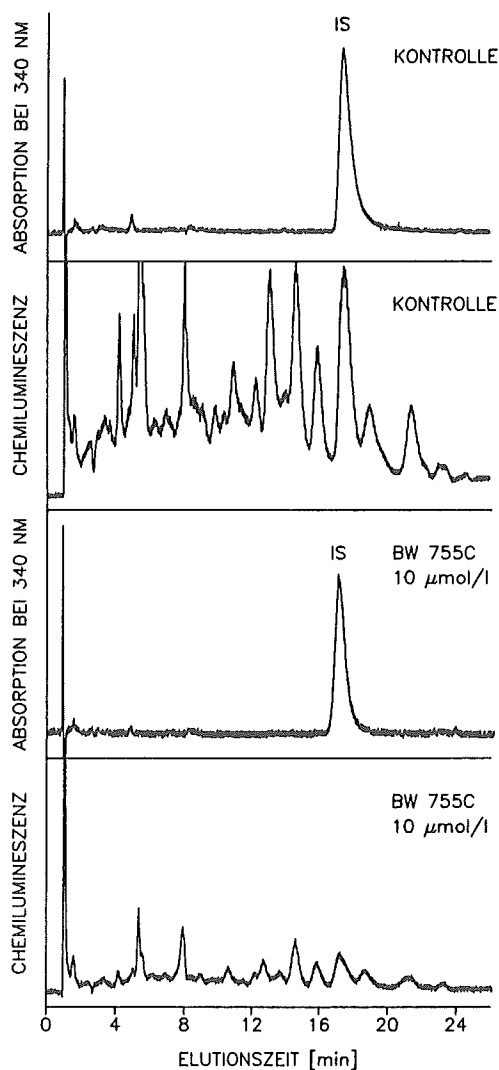


Abb. 4.75: Ablauf der Untersuchung der Substanzeffekte auf die Oxidation der Membranphospholipide.



**Abb. 4.76:** Inhibition der Oxidation von Membranphospholipiden durch BW 755C.

Dargestellt ist das RP-HPLC-Chromatogramm der Phospholipide nach einstündiger Inkubation von Schweine-Leukozytenmembranen mit Linolsäurehydroperoxid. Die Zellen waren zuvor 2 h in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. in Anwesenheit von 10 µmol/l BW 755C vorinkubiert worden (experimentelle Details in 4.11.2.4 bzw. 4.11.2.5). Alle Chemilumineszenzpeaks repräsentieren Phosphatidylcholinhydroperoxide mit unterschiedlicher Fettsäurebesetzung.

*Tab. 4.22: Inhibitorische Effekte verschiedener Referenzsubstanzen auf die Oxidation von Membranphospholipiden.*

Substanz		Inhibition IC <sub>50</sub> -Wert [ $\mu$ mol/l]
RP 64777		1,9
RP 63926	Probucol	16,6
RP 66151A	Ethoxyquin	0,6
RP 8694	NDGA	2,7
RP 65874		13,2
RP 51013	BW755C	15,5
RP 7465	BHT	14,0
RP 7347		27,0

## 5. ZELLULÄRE PARASITOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR AUFFINDUNG VON WIRKSUBSTANZEN

### 5.1 DNA-Synthese in *Trichomonas vaginalis*/ Wachstumskurve von *T. vaginalis*

#### 5.1.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit

*Trichomonas-vaginalis*-Parasiten aus 3 Tage alten Kulturen werden unter geeigneten Bedingungen in Gegenwart von  $^3\text{H}$ -Thymidin inkubiert; die von Trichomonaden inkorporierte Radioaktivität ist ein Maß für die DNA-Synthese und damit für die Proliferation dieser Parasiten. In Gegenwart von potentiell trichomonaziden Substanzen ist die Einbaurate von  $^3\text{H}$ -Thymidin vermindert. Die Wirkung einer Substanz wird in Prozent Änderung der Inkorporationsrate gegenüber der Kontrolle ausgedrückt.

Dieser Test erfaßt wegen der relativ kurzen Inkubationsdauer in erster Linie die trichomonaziden Eigenschaften von Testsubstanzen. *Trichomonas vaginalis* ist ein relativ häufiger, kosmopolitischer einzelliger Parasit, der vorwiegend die weiblichen Genitalschleimhäute befällt und spezifische und unspezifische Immunantworten hervorruft, deren Studium die Entwicklung besser geeigneter Primärscreeningmodelle für antiparasitäre Pharmaka ermöglichen soll.

Drei Tage alte Trichomonaden werden 1 Woche in einem geeigneten Kulturmedium inkubiert, wobei alle 24 h die Vermehrungsrate der Parasiten mikroskopisch bestimmt wird. Nach Trypanblau-Färbung ist eine Differenzierung in lebende und abgestorbene Protozoen möglich. In diesem Test können trichomonastatische Wirkungen von Substanzen deutlich gemacht werden.

#### 5.1.2 Material und Methoden

##### 5.1.2.1 Parasit

Verwendet wird zum einen ein in Kultur bereits etablierter *T.-vaginalis*-Stamm (Nr. 60 Teras, übernommen am 04.08.1982 vom Institut für Medizinische Parasitologie der Universität Bonn) und zum anderen ein frisch isolierter *Trichomonas*-



Stamm. Beide Stämme unterscheiden sich in ihrem Wachstumsverhalten nur geringfügig.

#### **5.1.2.2 Kultur- und Versuchsmedien**

a) Diamond's Medium ohne Agar (Diamond, 1957):

- 2,0 g Trypticase-Peptone (Fa. BBL/Becton & Dickinson)
- 1,0 g Hefeextract (Fa. Sigma)
- 0,5 g Maltose (Fa. Sigma)
- 0,1 g L-Cysteinhydrochlorid (Fa. Sigma)
- 0,02 g Ascorbinsäure (Fa. Sigma)
- 90 ml Aqua dest.
- 10 ml Lammserum (Fa. Flow)
- 25.000 IU Penicillin (Fa. Flow)
- 25.000 µg Streptomycin (Fa. Flow)
- 5.000 IU Mycostatin (Fa. Nunc)\*
- 10 mg Gentamycin (Fa. Nunc)\*
- 30 µg Fungizone<sup>(R)</sup> Squibb (Fa. Flow)\*
- (\* wird nur bei Kontamination hinzugefügt)

b) RPMI-1640-Medium (Fa. Nunc) unter Zusatz von:

- 10 % foetalem Kälberserum (Fa. Flow)
- 100 IU Penicillin/ml (Fa. Flow)
- 100 µg Streptomycin/ml (Fa. Flow)
- 2 mmol Glutamin (Fa. Nunc)
- $5 \times 10^{-5}$  mol/l 2-Mercaptoethanol (Fa. Merck)

#### **5.1.2.3 Reagenzien**

- [5'-<sup>3</sup>H]-Thymidin (spez. Aktivität 5-10 Ci/mmol;  
Fa. Amersham)
- Trypanblau (Fa. Nunc)

#### **5.1.2.4 Kultivierung und Konservierung der Parasiten**

Die Haltung der Parasiten erfolgt axenisch in Diamond's Medium ohne Agar (Diamond, 1957). Inkubiert wird in feuchter Atmosphäre bei 37 °C und 3 % CO<sub>2</sub>. Ein Überimpfen der Kulturen auf frisches Medium ist in Abständen von 48-72 Stunden erforderlich. Eine Konservierung des Parasitenmaterials ist mit 10 % DMSO bei Tiefkühlung (-70 °C) über einen längeren Zeitraum (ca. 2 Jahre) möglich.

#### 5.1.2.5 Versuchsdurchführung

Zur Bestimmung der DNA-Syntheserate wird der Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin in die parasitäre DNA quantifiziert. Hierzu werden Parasiten aus 3 Tage alten Kulturen verwendet. Mittels Trypanblau-Färbung (Versuchsmedium: 0,4 % Trypanblau = 1:4; 2 min) wird mikroskopisch der Prozentsatz lebender Trichomonaden bestimmt und auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$  Parasiten/20 ml eingestellt (Zählkammer). Für den erforderlichen Wechsel des Diamond's Medium gegen das RPMI-1640-Medium mit den unter b) angegebenen Zusätzen werden die Parasiten abzentrifugiert (Heraeus Minifuge GL, 3.000 Upm, 5 min). Die Trichomonadensuspension wird in Gegenwart von  $1 \mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -Thymidin und der jeweiligen Testsubstanz in den Konzentrationen  $0,1 \mu\text{g/ml}$ ,  $1 \mu\text{g/ml}$  und  $10 \mu\text{g/ml}$  24 h in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen, U-förmiger Boden) in feuchter Atmosphäre bei  $37^\circ\text{C}$  und 3 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nicht inkorporierte Radioaktivität wird in einem "cell harvester" (Fa. Titertek) ausgewaschen und die intrazelluläre Radioaktivität in einem Liquid Szintillation Counter (LKB 1216 Rack Beta II) bestimmt. Die Wirkung einer Prüfsubstanz wird in Prozent Änderung der Inkorporationsrate gegenüber der Kontrolle ausgedrückt.

Zur Bestimmung der Wachstumskurve werden 10 ml-Kulturröhrchen mit Diamond's Medium und den zu prüfenden Substanzen in den Konzentrationen  $0,1 \mu\text{g/ml}$ ,  $1 \mu\text{g/ml}$  und  $10 \mu\text{g/ml}$  sowie mit ca.  $4 \times 10^5$  Trichomonaden aus 3 Tage alten Kulturen beimpft und bei  $37^\circ\text{C}$  in feuchter Atmosphäre und 3 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Alle 24 h, also nach 24, 48, 72 und 96 h wird die Vermehrungsrate der Trichomonaden nach gutem Mischen der Kulturröhrchen mikroskopisch bestimmt. Durch die Färbung mit Trypanblau ist eine Differenzierung in lebende und bereits abgestorbenen Protozoen möglich.

### 5.1.3 Ergebnisse und Diskussion

#### 5.1.3.1 Entwicklung des Modells

Mit  $^3\text{H}$ -Thymidin konnte eine reproduzierbare radioaktive Markierung der Trichomonaden erreicht werden. Als Referenzsubstanz wurde Metronidazol (5  $\mu\text{m}/\text{ml}$ ) ausgewählt. Metronidazol hemmt dosisabhängig die DNA-Synthese (Tab. 5.1) und das Wachstum der Trichomonaden (Abb. 5.1).

Untersuchungen mit weiteren Referenzsubstanzen zeigten, das neben trichomonaziden Mitteln auch Antimykotika (z.B. Canesten<sup>R</sup>) und Chloroquin als primäres Antimalariamittel eine gute Wirkung hatten, so daß eine gewisse Indikatorfunktion dieser Tests auch für andere Parasiten abgeleitet werden kann (Tab. 5.2, Abb. 5.2).

Im Berichtszeitraum wurden 278 Substanzen in diesen Screening-Modellen geprüft; davon erwiesen sich 17 Verbindungen als mittelstark bis sehr gut wirksam.

Tab. 5.1: Konzentrationsabhängige Inhibition der DNA-Synthese in *T. vaginalis* durch Metronidazol  
Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (S.E.) der Änderung der Menge inkorporierten  $^3\text{H}$ -Thymidins in dpm (Zerfälle pro Minute).

Konzentration	% Veränderung vs. Kontrolle	S.E.	n
1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	+ 3,50	15,79	4
5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	- 49,75	7,89	4
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	- 58,25	9,42	4

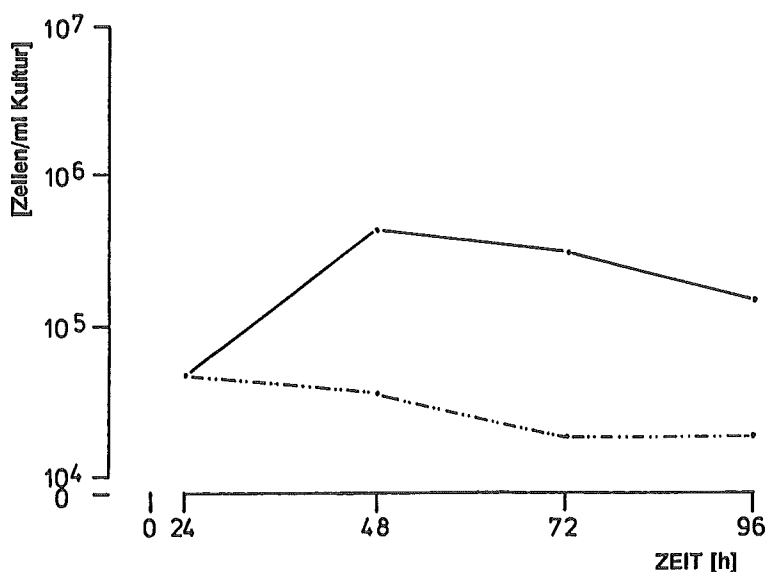


Abb. 5.1: Wachstumskurve von *T. vaginalis* in Kultur und Inhibition durch Metronidazol; angegeben sind Mittelwerte:

(-.-.-.-) = Kontrolle (n=34)

(—) = Metronidazol 1 µg/ml (n=38)

Tab. 5.2: Inhibition der DNA-Synthese in *Trichomonas vaginalis* durch Referenzsubstanzen. Angegeben sind Mittelwerte der Änderung der Menge inkorporierten <sup>3</sup>H-Thymidins in dpm (Zerfälle pro Minute).

Substanz (Handelsname)	Konzentration (µg/ml)	% Änderung vs. Kontrolle
Nimorazol (Acterol <sup>R</sup> )	0,1	-10
	1	- 8
	10	-72
Tinidazol (Simplotan <sup>R</sup> )	0,1	+52
	1	+43
	10	-71
Clotrimazol (Canesten <sup>R</sup> )	0,1	+12
	1	+ 6
	10	-32
Nifuratel (Inimur <sup>R</sup> )	0,1	-26
	1	-24
	10	-61
Natamycin (Pimafulcin <sup>R</sup> )	0,1	-2
	1	-14
	10	-15
Chloroquin (Resochin <sup>R</sup> )	0,1	-25
	1	-36
	10	-44

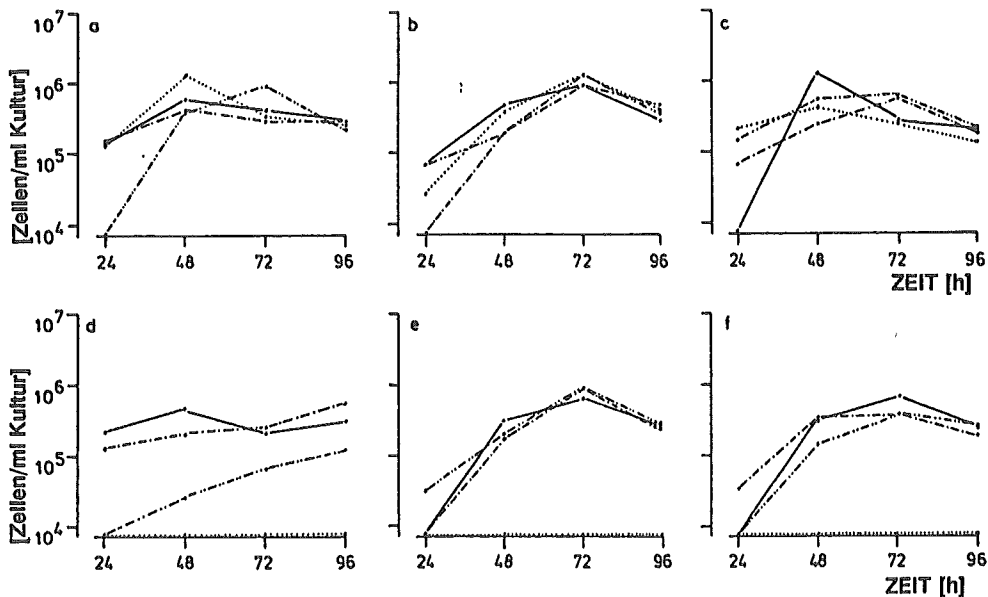


Abb. 5.2: Wachstumskurven von *T.vaginalis* in Kultur und Inhibition durch Referenzsubstanzen.

- a) Clotrimazol (Canesten<sup>R</sup>);
- b) Chloroquin (Resochin<sup>R</sup>);
- c) Natamycin (Pimarufin<sup>R</sup>);
- d) Nifuratel (Inimur<sup>R</sup>);
- e) Nimarozol (Acterol<sup>R</sup>);
- f) Tinidazol (Simplotan<sup>R</sup>);
- (-.-.-.-) 0,1 µg/ml
- (-.-.-.-) 1 µg/ml
- (.....) 10 µg/ml
- (——) Kontrolle

#### 5.1.3.2 In-vitro-/In-vivo-Korrelation

Um eine Korrelation der in vitro erzielten Ergebnisse mit in vivo erhobenen herstellen zu können, war zunächst damit begonnen worden, mit *Trichomonas vaginalis* ein geeignetes In-vivo-Modell zu etablieren; dabei wird durch subkutane oder durch intraperitoneale Infektion der Maus mit diesen Parasiten eine Entzündungsreaktion hervorgerufen, die mit der vaginalen Infektion im humanen Bereich zu vergleichen ist. Erste Versuche hatten jedoch gezeigt, daß die bei Nattermann gehaltenen *Trichomonas vaginalis*-Stämme aufgrund der permanenten Kultivierung ihre Virulenz für Mäuse verloren hatten. Daher wurde an Stelle von *Trichomonas vaginalis* der tierpathogene *Trichomonas fetus* ausgewählt. Mit dem eingesetzten Stamm, der 1950 durch O. Wagner isoliert und 1984 von der Hoechst AG übernommen wurde, konnte bei einer Infektionsdosis von

$1,9 \times 10^7$  Parasiten/Maus eine Mortalität von 72 % ( $n = 50$ ) innerhalb der ersten Woche p.i. erzielt werden.

Die Haltung der Parasiten erfolgte axenisch in Standard-I-Nährbouillon (Fa. Merck), die aus

Pepton aus Fleisch	7,8 g/l
Pepton aus Casein	7,8 g/l
Hefeextrakt	2,8 g/l
Natriumchlorid	5,6 g/l
D(+)-Glucose	1,0 g/l

bestand und der 10 % inaktiviertes Pferdeserum (Fa. Flow) sowie 250.000 IU Penicillin (Fa. Flow) und 250 mg Streptomycin (Fa. Flow) zugesetzt wurden. Inkubiert wurde in feuchter Atmosphäre bei 37 °C und 3 % CO<sub>2</sub>, wobei ein Überimpfen der Kulturen auf frisches Medium alle 48-72 h erforderlich war.

Als Versuchstiere wurden weibliche NMRI-Mäuse mit einem Körpergewicht von 18-30 g eingesetzt. Für die In-vivo-Prüfung von Substanzen wurden Kulturröhrchen 24 h inkubiert, die Trichomonaden gepoolt und in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Parasiten/Maus intraperitoneal appliziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. wurden die Testsubstanzen i.p. oder p.o. verabreicht sowie die Parasiten aus der Bauchhöhle gespült und ihre Anzahl mikroskopisch bestimmt (Trypanblau-Färbung zur Differenzierung tot/lebend).

Die Referenzsubstanz Metronidazol (Clont<sup>R</sup>) hemmt nach intra-peritonealer Injektion das Parasitenwachstum dosisabhängig und langanhaltend, während nach oraler Applikation nur die Dosierung 100 mg/kg einen zwar geringen, aber dennoch deutlichen Effekt zeigte (Abb. 5.3).

Da der maximale Effekt der Referenzsubstanz zum Zeitpunkt 48 h p.i. nachgewiesen werden konnte, wurde dieser Zeitpunkt auch für den Nachweis des Effektes der in vitro als wirksam befundenen Testsubstanzen ausgewählt. Von den geprüften drei Substanzen zeigten zwei eine gute bis sehr gute Hemmung in vivo, während NAT 06-055 nach oraler Applikation nicht wirksam war (Tab. 5.3). Für diese fehlende Wirksamkeit könnten mangelnde Absorption oder ausgeprägter First-Pass-Effekt verantwortlich sein. Weitere Untersuchungen sind für die Bestätigung der In-vivo-/In-vitro-Korrelation notwendig.

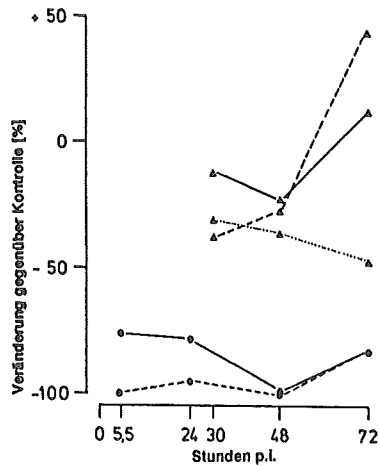


Abb. 5.3: Einfluß von Metronidazol (Clont<sup>R</sup>) auf die T.-fetus-induzierte Infektion der Mäus.

Die Tiere wurden mit  $5 \times 10^6$  Parasiten i.p. infiziert. Metronidazol wurde nach folgendem Zeitplan verabreicht:

- 10,0 mg/kg i.p., einfache Injektion, 2 h p.i.
  - 31,6 mg/kg i.p., einfache Injektion, 2 h p.i.
  - 10,0 mg/kg p.o., zwei Applikationen, 2 + 24 h p.i.
  - 31,6 mg/kg p.o., zwei Applikationen, 2 + 24 h p.i.
  - 100,0 mg/kg p.o., zwei Applikationen, 2 + 24 h p.i.
- Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden je 2 Tiere getötet, die Parasiten durch eine Peritonealspülung isoliert und unter dem Mikroskop ausgezählt.

Tab. 5.3: Screening auf Substanzen mit inhibitorischer Wirkung auf die T.-fetus-Infektionen der Maus. Die Substanzen wurden nach 2 und 24 h p.i. appliziert. Angegeben sind die prozentualen Veränderungen gegenüber der Kontrolle, n = 2. Weitere experimentelle Details sind in der Legende zu Abb. 5.3 angegeben.

Substanzen	Dosierung [mg/kg p.o.]	Effekt 48 h p.i. [% Änderung vs. Kontrolle]
NAT 06-087	100	-99,2
NAT 06-108	100	-42,9
NAT 06-055	100	+33,3

## **5.2 Zytotoxizitätstest - *Trichomonas vaginalis***

### **5.2.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Mit  $^3\text{H}$ -Thymidin radioaktiv markierte Trichomonaden (vergleiche Kapitel 5.1) werden in vitro mit Maus-Peritonealmakrophagen (unstimuliert und C.-parvum-aktiviert) inkubiert. Die nach Inkubation im Überstand freigesetzte Radioaktivität gibt Aufschluß über die Anzahl durch Makrophagen lysierter Zellen und damit getöteter Protozoen (Landolfo et al., 1981).

Der Test erfaßt neben Substanzen, die direkt gegen den Parasiten gerichtet sind, auch Substanzen, die durch Stimulation die Aktivität der Makrophagen erhöhen. Primäre Zielsetzung ist es, den Parasiten durch Stimulation der Wirtsreaktionen anzugreifen.

### **5.2.2 Material und Methoden**

#### **5.2.2.1 Parasit**

Verwendet wird zum einen ein in Kultur bereits etablierter T.-vaginalis-Stamm (Nr. 60 Teras, übernommen am 04.08.1982 vom Institut für Medizinische Parasitologie der Universität Bonn) und zum anderen ein frisch isolierter Trichomonas-Stamm. Beide Stämme unterscheiden sich in ihrem Wachstumsverhalten nur geringfügig.

#### **5.2.2.2 Kultur- und Versuchsmedien**

a) Diamond's Medium ohne Agar (Diamond, 1957):

- 2,0 g Trypticase-Pepton (Fa. BBL/Becton & Dickinson)
- 1,0 g Hefeextract (Fa. Sigma)
- 0,5 g Maltose (Fa. Sigma)
- 0,1 g L-Cysteinhydrochlorid (Fa. Sigma)
- 0,02 g Ascorbinsäure (Fa. Sigma)
- 90 ml Aqua dest.
- 10 ml Lammserum (Fa. Flow)
- 25.000 IU Penicillin (Fa. Flow)
- 25.000 µg Streptomycin (Fa. Flow)
- 5.000 IU Mycostatin (Fa. Nunc)\*
- 10 mg Gentamycin (Fa. Nunc)\*



30 µg Fungizone<sup>(R)</sup> Squibb (Fa. Flow)\*  
(\* wird nur bei Kontamination hinzugefügt)

- b) RPMI-1640-Medium (Fa. Nunc) unter Zusatz von:
- 10 % foetalem Kälberserum (Fa. Flow)
  - 100 IU Penicillin/ml (Fa. Flow)
  - 100 µg Streptomycin/ml (Fa. Flow)
  - 2 mmol Glutamin (Fa. Nunc)
  - 5 x 10<sup>-5</sup> mol/l 2-Mercaptoethanol (Fa. Merck)

#### 5.2.2.3 Reagenzien

- [5'-<sup>3</sup>H]-Thymidin (spez. Aktivität 5-10 Ci/mmol;  
Fa. Amersham)
- Trypanblau (Fa. Nunc)

#### 5.2.2.4 Kultivierung und Konservierung der Parasiten

Die Haltung der Parasiten erfolgt axenisch in Diamond's Medium ohne Agar (Diamond, 1957). Inkubiert wird in feuchter Atmosphäre bei 37 °C und 3 % CO<sub>2</sub>. Ein Überimpfen der Kulturen auf frisches Medium ist ca. alle 48-72 Stunden erforderlich. Eine Konservierung des Parasitenmaterials ist mit 10 % DMSO bei Tiefkühlung (-70 °C) über einen längeren Zeitraum (ca. 2 Jahre) möglich.

#### 5.2.2.5 Versuchsdurchführung

Zur Bestimmung der DNA-Syntheserate wird der Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin in die parasitäre DNA quantifiziert. Hierzu werden Parasiten aus 3 Tage alten Kulturen verwendet. Mittels Trypanblau-Färbung (Versuchsmedium: 0,4 % Trypanblau = 1:4; 2 min) wird mikroskopisch der Prozentsatz lebender Trichomonaden bestimmt und auf eine Konzentration von 1 x 10<sup>7</sup> Parasiten/20 ml eingestellt (Zählkammer). Für den erforderlichen Wechsel des Diamond's Medium gegen das RPMI-1640-Medium mit den unter b) angegebenen Zusätzen werden die Parasiten abzentrifugiert (Heraeus Minifuge GL, 3.000 Upm, 5 min). Die Trichomonadensuspension wird in Gegenwart von 1 µCi/ml <sup>3</sup>H-Thymidin und der jeweiligen Testsubstanz in den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml 24 h in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen, U-förmiger Boden) in feuchter Atmosphäre bei

37 °C und 3 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nicht inkorporierte Radioaktivität wird in einem "cell harvester" (Fa. Titertek) ausgewaschen und die intrazelluläre Radioaktivität in einem Liquid Szintillation Counter (LKB 1216 Rack Beta II) bestimmt. Die Wirkung einer Prüfsubstanz wird in Prozent Änderung der Inkorporationsrate gegenüber der Kontrolle ausgedrückt.

Zur Bestimmung der Wachstumskurve werden 10 ml-Kulturröhrchen mit Diamond's Medium und den zu prüfenden Substanzen in den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml sowie mit ca.  $4 \times 10^5$  Trichomonaden aus 3 Tage alten Kulturen beimpft und bei 37 °C in feuchter Atmosphäre und 3 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle 24 h, also nach 24, 48, 72 und 96 h wird die Vermehrungsrate der Trichomonaden nach gutem Mischen der Kulturröhrchen mikroskopisch bestimmt. Durch die Färbung mit Trypanblau ist eine Differenzierung in lebende und bereits abgestorbenen Protozoen möglich.

### *5.2.3 Ergebnisse und Diskussion*

Von den insgesamt ca. 20 durchgeführten Untersuchungen konnte nur in 75 % der Fälle überhaupt eine Zytotoxizität erreicht werden, die zwischen 7 % und 57 % schwankte. Bessere Reproduzierbarkeit konnte auch durch den Einsatz unterschiedlicher Mäuse- und Trichomonas-Stämme nicht erreicht werden. Da auch die verwendeten Makrophagen auf die Anwesenheit von *T. vaginalis* im Gegensatz zu opsonisiertem Zymosan häufig nicht mit einer Steigerung der Chemilumineszenz reagierten (Abb. 5.4), wurde dieses Testssystem aufgrund fehlender Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für einen Einsatz im Screening als unbrauchbar befunden und nicht weiter verfolgt.

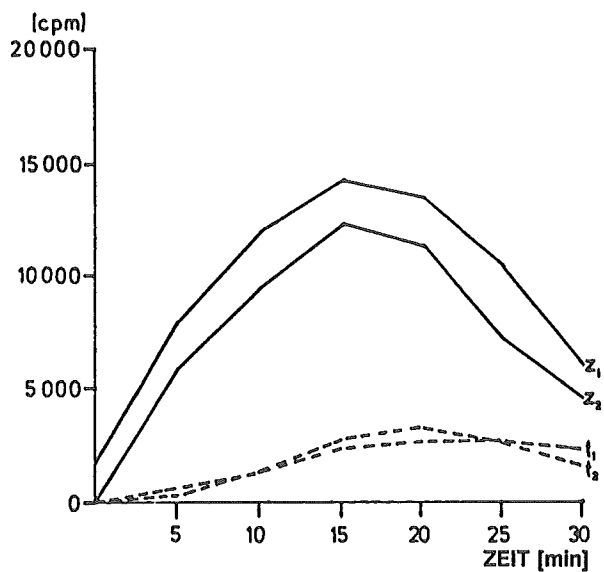


Abb. 5.4: Chemilumineszenz-Reaktion in *C.-parvum*-aktivierten Makrophagen (5 Tage vor dem Experiment) nach Stimulierung mit opsonisiertem Zymosan (Z) bzw. *T.vaginalis* (t). Die Abbildung zeigt zwei verschiedene Versuchsreihen.

### **5.3 Protein- und DNA-/RNA-Synthese in Plasmodium berghei**

#### **5.3.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

Für die Auffindung von Pharmaka gegen Malaria dient als Plasmodium *Plasmodium berghei*, der Erreger der Nagetier-Malaria. Dieser Parasit ruft bei Mäusen innerhalb weniger Wochen stets eine letale Infektion hervor und entspricht in seinen Eigenschaften am meisten dem humanen *Plasmodium falciparum*. Parasitierte Erythrozyten aus dem Blut einer infizierten Maus (Tag 7 p.i.) werden durch säulenchromatographische Abtrennung der Leukozyten (Howard et al., 1978) und Dichtegradientenzentrifugation (Eling, 1977a, b) isoliert und anschließend unter geeigneten Bedingungen in Gegenwart von  $^3\text{H}$ -Methionin (Proteinsynthese) oder  $^3\text{H}$ -Adenosin (DNA-/RNA-Synthese) inkubiert. Nach Auswaschen der eingebauten Radioaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation mittels eines "cell harvester" wird die in die Parasiten eingebaute Radioaktivität bestimmt und dient als Maß für den Stoffwechsel der Parasiten. In Gegenwart von Wirksubstanzen wird bei Hemmung der Protein- bzw. DNA/RNA-Synthese vermindert Radioaktivität in die Parasiten inkorporiert.

Da der Test im Mikrotitersystem durchgeführt wird, ist für ein gleichzeitiges Screening von bis zu 8 Prüfsubstanzen nur ein einziges Versuchstier nötig.

#### **5.3.2 Material und Methoden**

##### **5.3.2.1 Parasit**

Verwendet wird ein Erreger der Nagetier-Malaria: *Plasmodium berghei*, Stamm K173, der vom Institut für Cyto-/Histologie der Universität Nijmegen übernommen wurde. Dort wird der asexuelle erythrozytäre Zyklus dieses Einzellers seit ca. 20 Jahren durch wöchentliche intraperitoneale Übertragung von  $10^5$  parasitierten Erythrozyten permanent gehalten. Die Blutpassage erfolgt streng nach Mäusestamm und Geschlecht getrennt.

Bei Nattermann wurden für diesen Zweck männliche Swiss- und CD<sub>1</sub>-Mäuse verwendet.

### 5.3.2.2 Versuchstiere und -haltung

Verwendet werden männliche Swiss-Mäuse (Fa. Mus-Rattus, Brunnthal/München) und männliche CD<sub>1</sub>-Mäuse (Charles River, Sulzfeld), die bei Versuchsbeginn ein Gewicht von ca. 20 g haben.

Die Haltung erfolgt in Makrolon-Käfigen Nr. 2 unter Fütterung von Altromin-Standard-Diät und Wasser ad libitum.

### 5.3.2.3 Reagenzien und Trennmedien

- Sephadex G 150 superfine (Fa. Pharmacia)
- Servacel Cellulose-Ionenaustauscher SE23 (Fa. Serva, Heidelberg)
- Ficoll 400 (Fa. Pharmacia)
- Hank's Balanced Salt Solution
- 25 mmol Hepes-Puffer pH 7,2
- Heparin-Na (Liquemin<sup>R</sup>)
- foetales Kälberserum (hitzeinaktiviert) (Fa. Flow)
- HBSS = Hank's Balanced Salt Solution + 2 % Hepes-Puffer + 5 Einheiten Heparin/ml  
HBSS<sup>+</sup> = HBSS + 10 % foetales Kälberserum
- L-(Methyl-<sup>3</sup>H)-Methionin (spez. Akt. 5-15 Ci/mmol; Fa. Amersham)
- [2-<sup>3</sup>H]-Adenosin (spez. Akt. 20-25 Ci/mmol; Fa. Amersham)

### 5.3.2.4 Versuchsdurchführung

Pro Versuch wird eine infizierte Maus (Tag 7 oder Tag 8 p.i. mit 25 % - 40 % parasitierten Erythrozyten) unter Ethernarkose über den Orbitalplexus ausgeblutet. Das heparinisierte Blut (1 Tropfen Liquemin<sup>R</sup>/2 ml Blut) wird unmittelbar in einem Eisbad gekühlt, einmal mit HBSS<sup>+</sup> gewaschen und zentrifugiert (5 min, 3.000 Upm, Heraeus Minifuge GL).

Die Trennung der Erythrozyten von Leukozyten und Thrombozyten erfolgt säulenchromatographisch nach einer modifizierten Vorschrift von Howard et al., 1978. Zu diesem Zweck werden 5 ml-Plastikspritzen nach Abdichtung der Basis mit Nylonwolle mit etwa 3 ml Gel in HBSS gefüllt. Die Gelmischung besteht aus 6 g Sephadex G-150 und 2 g Ionenaustauscher SE23, die 3 Tage

bei 4 °C und 150 ml physiologischer NaCl-Lösung vorgequollen sind und dann mit HBSS<sup>+</sup> gewaschen werden.

Die mit HBSS<sup>+</sup> eluierten Erythrozyten werden mit Hilfe einer Ficoll-Fraktionierung (Eling, 1977a, b) in infizierte und nichtinfizierte Zellen getrennt. Zu diesem Zweck wird die Erythrozyten-Suspension auf eine 28 %ige Ficoll-Lösung in HBSS aufgetropft und 15 min bei 4.900 Upm (Heraeus Minifuge GL) bei 4°C zentrifugiert. Die parasitierten Erythrozyten setzen sich im Übergang vom Medium zum Ficoll ab. Nach Auswaschen der Ficoll-Reste wird die Anzahl der Erythrozyten mikroskopisch (Zählkammer) bestimmt und mit HBSS<sup>+</sup> auf  $5,5 \times 10^7/\text{ml}$  eingestellt.

Jeweils 0,8 ml Erythrozyten-Suspension werden mit <sup>3</sup>H-Methionin bzw. <sup>3</sup>H-Adenosin und mit den Testsubstanzen in einer Konzentration von 10, 30 und 100 µg/ml versetzt. Nach 30, 90 und 120 min Inkubation bei 37 °C und 3 % CO<sub>2</sub> in feuchter Atmosphäre werden 0,1 ml Probe 1:10 mit HBSS<sup>+</sup> verdünnt und davon jeweils 2 x 0,1 ml in Mikrotiterplatten pipettiert. Die nicht inkorporierte Radioaktivität wird in einem "cell harvester" (Fa. Titertek) ausgewaschen und die zellgebundene Radioaktivität nach Zugabe von 2 ml Unisolve (Fa. Zinsser) in einem Liquid Szintillation Counter (LKB 1216 Rack Beta II) quantifiziert.

Die in den einzelnen Proben gemessene Radioaktivität wird ermittelt und als dpm/parasitierter Erythrozyt angegeben. Die Wirkung einer Prüfsubstanz wird als prozentuale Änderung im Vergleich zur Kontrolle ausgedrückt.

### ***5.3.3 Ergebnisse und Diskussion***

#### ***5.3.3.1 Entwicklung des Modells***

Die verwendeten radioaktiv markierten Precursor werden unter normalen Bedingungen zeitabhängig von den parasitierten Erythrozyten aufgenommen (Abb. 5.5), wobei durch Fällung mit Trichloressigsäure sichergestellt werden konnte, daß die gemessene <sup>3</sup>H-Methionin-Radioaktivität nahezu ganz in der hochmolekularen Fraktion der parasitierten Erythrozyten zu finden ist (Abb. 5.6).

Weitere Untersuchungen hatten das Ziel, den Einfluß von Lösungsvermittlern für Prüfsubstanzen auf die Inkorporation der Radioaktivität zu bestimmen. Als Lösungsvermittler eignen sich Aceton, Ethanol und DMF bis zu einer Konzentration von 5 %, während man DMSO bis zu einer Konzentration von 10 % dem Inkubationsmedium zusetzen kann. Der Zusatz von Ethanol bis zu einer Konzentration von 10 % hingegen führt zu einer deutlichen Verminderung der inkorporierten Radioaktivität (Abb. 5.5).

Die Prüfung von Referenzsubstanzen ergab, daß in diesem Test nicht nur Antimalariamittel, sondern auch Zytostatika wirksam sind (Tab. 5.4). Aus der Tatsache, daß Chloroquin (Resochin<sup>R</sup>) nur eine relativ geringe Wirkung aufweist, kann man schließen, daß auch Substanzen mit nur geringer Wirkung in diesem In-vitro-Testsystem durchaus eine Wirkung in vivo haben können. Das macht ein etwas breiteres In-vivo-Screening auch für Substanzen mit nur relativ geringer In-vitro-Wirkung erforderlich.

Im Projektzeitraum wurden zahlreiche Prüfsubstanzen auf ihre Hemmwirkung auf die Protein- und DNA-/RNA-Synthese in Plasmodium berghei hin geprüft. Von insgesamt 169 Substanzen zeigten 48 % eine mittlere bis sehr starke Hemmung (30 % - 100 %) des <sup>3</sup>H-Methionin-Einbaus und wurden ergänzend in der DNA-/RNA-Synthese geprüft. Hier wiesen 52 von 61 geprüften Substanzen eine starke Inhibition der Inkorporation von <sup>3</sup>H-Adenosin in die Nukleinsäuren der Plasmodien auf.

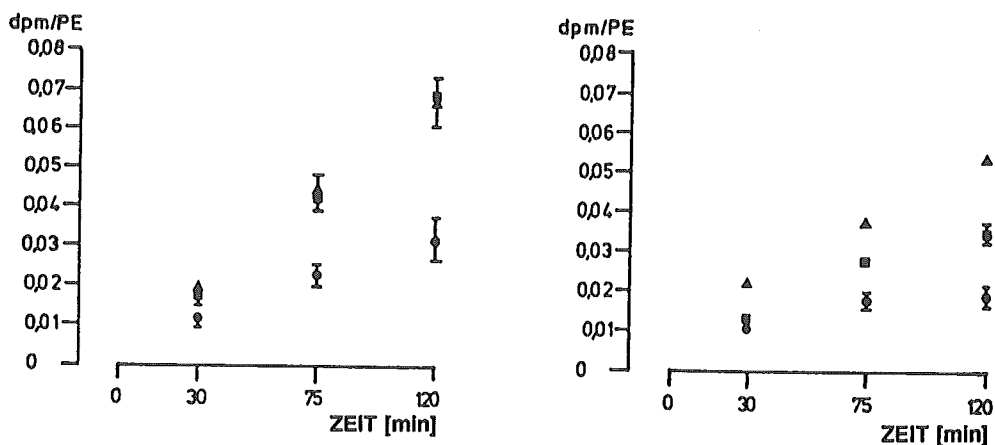


Abb. 5.5: Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Methionin und  $^3\text{H}$ -Adenosin in parasitierte Erythrozyten.

PE parasitierten Erythrozyten

▲ Kontrolle

■ 10 % DMSO

● 10 % Ethanol

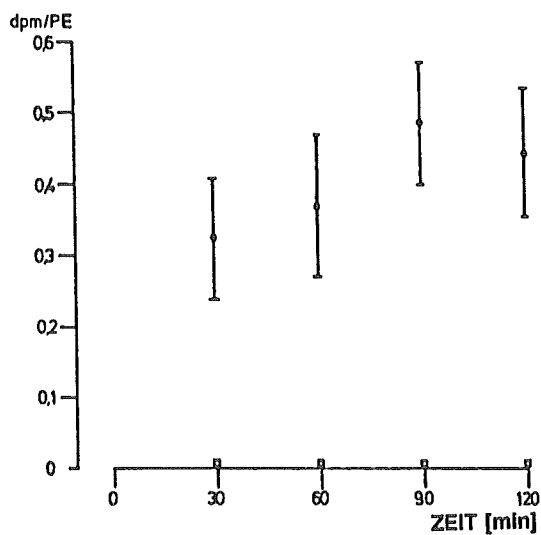


Abb. 5.6: Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Methionin in die hochmolekulare Fraktion von parasitierten Erythrozyten.

PE parasitierte Erythrozyten

● hochmolekulare Fraktion

□ niedermolekulare Fraktion



Tab. 5.4: Einfluß von Referenzsubstanzen auf die Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Methionin (Proteinsynthese) bzw.  $^3\text{H}$ -Adenosin (DNA-/RNA-Synthese) in parasitierte Erythrocyten. Angegeben ist die prozentuale Änderung gegenüber der Kontrolle nach 2stündiger Inkubation.

Substanz (Handelsname)	Inkorporation von $^3\text{H}$ -Methionin Proteinsynthese [ $\mu\text{g/ml}$ ]			Inkorporation von $^3\text{H}$ -Adenosin DNA-/RNA-Synthese [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
	10	30	100	10	30	100
Actinomycin	-14	-31	-20	-77	-87	-91
Azathioprin (Imurek <sup>R</sup> )	+107	+65	-48			
Bleomycin	- 3	+ 4	- 6	+ 5	+13	+11
Chloroquin (Resochin <sup>R</sup> )	- 5	- 6	-19			
Colchicin	+10	+10	-15	- 7	- 9	-26
Cyclophosphamid (Endoxan <sup>R</sup> )	+ 3	- 8	+ 6			
Dexamethason	+118	+90	- 1			
5-Fluorouracil	+20	- 1	-13	- 9	- 3	-20
Metronidazol	+15	+ 0,2	- 1			
Pyrimethamin (Daraprim <sup>R</sup> )	-13		-67	+15		-35
Quinin	-22		-27	-10		-16
Sulfadoxin/ Pyrimethamin (Fansidar <sup>R</sup> )	0		-80	- 6		-67
Vinblastin	- 2	- 1	-21	- 2	-22	-52

### 5.3.3.2 In-vitro-/In-vivo-Korrelation

Als In-vivo-Modell zur Prüfung der in vitro wirksamen Substanzen wurde ein Plasmodium-berghei-Maus-Modell etabliert. Dabei kann durch intraperitoneale Infektion mit parasitierten Erythrozyten bei den eingesetzten Mäusestämmen ein Krankheitsverlauf erzeugt werden, der innerhalb von maximal 14 Tagen zur Mortalität führt. Eine Verlängerung der Überlebens-

zeit bzw. Reduktion der anhand des Blutausstrichs bestimmten Parasitämie in Gegenwart von Substanzen deutet auf potentielle Antimalariamittel hin.

Für jeden Versuch wird eine infizierte Maus (Tag 7 oder Tag 8 p.i. mit 25 % - 40 % parasitierten Erythrozyten) unter Ether-narkose über den Orbitalplexus ausgeblutet. Die Parasitämie wird mittels eines Ausstrichs (Giemsa-Färbung) bestimmt. Die Anzahl der Erythrozyten wird mikroskopisch (Zählkammer) bestimmt; die Erythrozyten-Suspension wird mit 0,9 % NaCl auf eine Konzentration von  $5 \times 10^5$  Parasiten/ml eingestellt. Die Versuchstiere erhalten 0,2 ml Parasiten-Suspension ( $10^5$  Zellen) intraperitoneal injiziert. Am 2., 3. und 4. Tag nach der Injektion erfolgt die Applikation der Substanzen in den Dosierungen 31,6 und 100 mg/kg Körpergewicht. Die Kontrollgruppe erhält nur Lösungsmittel. Am Tag 7 p.i. wird eine Kontrolle der Parasitämie über Blutausstriche durchgeführt. Als zweiter Parameter für die Wirksamkeit der Prüfsubstanzen wird die Mortalitätsrate bestimmt.

Alle geprüften Referenzsubstanzen, darunter auch Chinin und Chloroquin, konnten den Infektionsverlauf teilweise bzw. ständig unterdrücken (Tab. 5.5).

Alle Substanzen, die in vitro die Protein- bzw. DNA-/RNA-Biosynthese inhibierten, wurden einer Prüfung in dem In-vivo-Modell "Plasmodium-berghei-Maus" unterzogen. Trotz unterschiedlicher Applikationsformen erwies sich keine der geprüften Substanzen in diesem Modell als wirksam, und das weder im Hinblick auf die Unterdrückung der Parasitämie noch auf die Verlängerung der Überlebenszeit. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß für das Screening auf Substanzen, die potentielle Antimalaria-Wirksamkeit besitzen, ein solches In-vitro-Screening nur bedingt geeignet ist. Die fehlende In-vivo-Wirksamkeit könnte allerdings auf die zu geringe Bioverfügbarkeit der Substanzen nach oraler Applikation oder auf starke Metabolisierung zurückzuführen sein. Möglicherweise auch hat das In-vitro-Modell falsch positive Ergebnisse geliefert, da der sehr fragile parasitierte Erythrozyt bereits geringste zytotoxische Effekte anzeigt, und eine Differenzierung zwischen antiparasitären und zytotoxischen Effekten in diesem Test nicht möglich ist.

Tab. 5.5: Einfluß von Referenzsubstanzen auf die Infektion der Maus mit *P.berghei*.

Substanz	tägl. Dos. [mg/kg]	Appl.- Art	Tag p.i.	Parasit- ämie [%] x ± sd	Mortalität Tag p.i. x ± sd	n
Quinic NaCl (Kontrolle)	3x140	i.p. i.p.	5-9 5-9	3 ± 6 56 ± 7	15 ± 6 8 ± 1	8 8
Chloroquin (Nivaquine <sup>R</sup> )	31,6 31,6 100	i.p. p.o. p.o.	5-7 5-7 5-7	0 0 0	- - -	4 4 8
NaCl (Kontrolle)		p.o.	5-7	27 ± 8	9 ± 1	12
Pyrimethamin (Daraprim <sup>R</sup> )	100	p.o.	2/3/4	0	-	8
Pyrimethamin- Sulfadoxin (Fansidar <sup>R</sup> )	100	p.o.	2/3/4	0	-	8
Azathioprin (Imurek <sup>R</sup> )	100	p.o.	2/3/4	42 ± 16	9 ± 1	4
Cyclophosphamid (Endoxan <sup>R</sup> )	100	p.o.	2/3/4	12 ± 12	21 ± 5	4
Cyclosporin A (Sandimmun <sup>R</sup> )	100	p.o.	2/3/4	0.2±0.7	>22	4
Dexamethason	100	p.o.	2/3/4	37 ± 13	18 ± 10	4
NaCl (Kontrolle)	100	p.o.	2/3/4	39 11	8 ± 1	8

## *5.4 Plasmodium-berghei-Phagozytose-Test*

### *5.4.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit*

Mit  $^3\text{H}$ -Methionin-markierten Plasmodien infizierte Maus-Erythrozyten werden in vitro mit Maus-Peritoneal-Makrophagen (resident und C.-parvum-aktiviert) oder der Maus-Makrophagen-Zelllinie P388D<sub>1</sub> inkubiert. Die - nach Inkubation und Abspülen der nicht von den Makrophagen aufgenommenen parasitierten Erythrozyten - in die Makrophagen inkorporierte Radioaktivität gibt Aufschluß über die Anzahl der von den Makrophagen aufgenommenen Plasmodien und somit über die Makrophagen-Aktivität. Um sicherzustellen, daß nur wirklich phagozytierte Plasmodien erfaßt werden und nicht solche, die locker mit der Makrophagen-Zellmembran assoziiert sind, wird parallel eine mikroskopische Kontrolle mittels licht-mikroskopischer Autoradiographie durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methoden kann auch die an der Phagozytose beteiligte Anzahl Makrophagen bestimmt werden.

Der Test ermöglicht es, Substanzen zu finden, die einen stimulierenden oder hemmenden Einfluß auf die Immunabwehr des Wirtstieres besitzen.

### *5.4.2 Material und Methoden*

#### *5.4.2.1 Parasit*

Verwendet wird ein Erreger der Nagetier-Malaria: Plasmodium berghei, Stamm K173, der vom Institut für Cyto-/Histologie der Universität Nijmegen übernommen wurde. Dort wird der asexuelle erythrozytäre Zyklus dieses Einzellers seit ca. 20 Jahren durch wöchentliche intraperitoneale Übertragung von  $10^5$  parasitierten Erythrozyten permanent gehalten. Die Blutpassage erfolgt streng nach Mäusestamm und Geschlecht getrennt.

Bei Nattermann wurden für diesen Zweck männliche Swiss- und CD<sub>1</sub>-Mäuse verwendet.

#### 5.4.2.2 Versuchstiere und -haltung

Verwendet werden männliche Swiss-Mäuse (Fa. Mus-Rattus, Hofoldinginger Straße 17, 8011 Brunnthal/München) und männliche CD<sub>1</sub>-Mäuse (Charles River, Sulzfeld), die bei Versuchsbeginn ein Gewicht von ca. 20 g haben.

Die Haltung erfolgt in Makrolon-Käfigen Nr. 2 unter Fütterung von Altromin-Standard-Diät und Wasser ad libitum.

#### 5.4.2.3 Reagenzien und Trennmedien

- Sephadex G 150 superfine (Fa. Pharmacia)
- Servacel Cellulose-Ionenaustauscher SE23 (Fa. Serva, Heidelberg)
- Ficoll 400 (Fa. Pharmacia)
- Hank's Balanced Salt Solution
- 25 mmol Hepes-Puffer pH 7,2
- Heparin-Na (Liquemin<sup>R</sup>)
- foetales Kälberserum (hitzeinaktiviert) (Fa. Flow)
- HBSS = Hank's Balanced Salt Solution + 2 % Hepes-Puffer + 5 Einheiten Heparin/ml  
HBSS<sup>+</sup> = HBSS + 10 % foetales Kälberserum
- L-(Methyl-<sup>3</sup>H)-Methionin (spez. Akt. 5-15 Ci/mmol; Fa. Amersham)
- [<sup>3</sup>H]-Adenosin (spez. Akt. 20-25 Ci/mmol; Fa. Amersham)

RPMI-1640-Medium (Fa. Nunc) mit Zusatz von:

- 10 % foetales Kälberserum (FKS) (Fa. Flow)
- 100 IU/ml Penicillin (Fa. Flow)
- 100 µg/ml Streptomycin (Fa. Flow)
- Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)  
HBSS + Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> enthält 0,185 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O,  
0,1 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,1 g/l MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O
- Corynebacterium parvum (Deutsche Wellcome, Burgwedel)
- Antimaus-Erythrozyten-Serum (Fa. Cappel, Dynatech, Denkendorf)
- Soluene 350 (Fa. Packard)

Reagenzien für lichtmikroskopische Autoradiographie:

- G5-Photoemulsion (Fa. Ilford)
- Brussels Amidol (35 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 18 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> und 0,8 g KBr/l A.dest.; vor Gebrauch werden 1,125 g Amidol = 4-Hydroxy-m-

phenylen-diammoniumdichlorid/250 ml hinzugegeben)  
- 30 %iges  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

#### **5.4.2.4 Gewinnung von stimulierten Maus-Peritoneal-Makrophagen**

Fünf Tage vor Beginn des Versuches werden die Peritoneal-Makrophagen von Mäusen durch intraperitoneale Injektion von 1,4 mg *Corynebacterium parvum* in 0,2 ml stimuliert.

Bei Ex-vivo-Versuchen werden die Prüfsubstanzen 2 - 7 Tage vor der Isolierung der Makrophagen p.o. oder i.p. appliziert.

Die Mäuse werden durch Genickbruch getötet und Makrophagen mit 2 x 5 ml HBSS ohne  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$  aus der Bauchhöhle ausgespült. Die Zellen werden in einer Zählkammer gezählt und auf eine Zahl von  $1 \times 10^6$  mit HBSS unter Zusatz von  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  und 5 % foetalem Kälberserum eingestellt.

#### **5.4.2.5 Kultivierung der Makrophagen-Zelllinie P388D<sub>1</sub>**

Die P388D<sub>1</sub>-Maus-Makrophagen (American Type Culture Collection) werden in RPMI-1640-Medium unter Zusatz von 10 % foetalem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 3 %  $\text{CO}_2$  in feuchter Atmosphäre in Petrischalen ( $\phi$  10 cm) kultiviert. Für die Versuche werden 5 Tage alte Kulturen verwendet. Die Zellen werden mittels eines "rubber policeman" abgelöst, gepoolt und einmal mit HBSS + 5 % FKS gewaschen (Heraeus Minifuge GL, 1.000 Upm, 10 min).

#### **5.4.2.6 Versuchsdurchführung**

$1 \times 10^6$  Makrophagen werden in Zellkulturplatten (Multidish 24-wells; Nunc. Wiesbaden) pipettiert und 3 h bei 37 °C und 4 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach Abwaschen der nicht adhärennten Zellen mit HBSS/5 % FKS werden 0,1 ml Substanzlösung mit 0,9 ml Medium bzw. 1 ml Medium (Kontrolle) zugefügt und 2 - 20 h inkubiert. Danach wird das Medium ausgetauscht gegen 0,8 ml Parasiten-Suspension ( $7,5 \times 10^5$  parasitierte Erythrozyten/ml;  $^3\text{H}$ -Methionin-markiert: siehe 5.3), 0,1 ml Antimäus-Erythrozyten-Serum und 0,1 ml der zu prüfenden Substanz bzw. 0,1 ml Kontrollmedium. Nach 90minütiger Inkubation bei 37 °C und 4 %

CO<sub>2</sub> werden die nichtphagozytierten parasitierten Erythrozyten abgespült und die adhärenenten Makrophagen mit phagozytiertem Material mit dem Gewebeauflöser Soluene 350, der vor Gebrauch mit Isopropanol 1:1 gemischt wird, abgelöst und die inkorporierte Radioaktivität szintillationsluminometrisch quantifiziert.

Aus den Mittelwerten der Proben wird die Anzahl der phagozytierten Parasiten bestimmt und als prozentuale Änderung zur Kontrolle ausgedrückt:

$$\frac{\text{x dpm (Probe)} \times 6 \times 10^5}{\text{x dmp Gesamtzahl der parasitierten Erythrozyten}}$$

Für die Autoradiographie werden die Objektträger mit G5 Emulsion (Fa. Ilford) nach der "Dipping"-Methode (Williams, 1977; Rogers, 1979) behandelt. Die Exposition findet bei 4 °C 1,5 bis 3 Tage lang statt. Entwickelt wird in Brüssels Amidol 20 min bei 12 °C, fixiert in 30 %igem Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 8 min.

#### **5.4.3 Ergebnisse und Diskussion**

##### **5.4.3.1 Entwicklung des Modells**

Erste Experimente dienten dem Ziel herauszufinden, ob residente oder C.-parvum-aktivierte Makrophagen stärkere phagozytierende Potenz besitzen und ob die Phagozytoserate durch Opsonisierung mit Antimaus-Erythrozyten-Serum gesteigert werden kann. Die in den Abbildungen 5.7 und 5.8 graphisch dargestellten Ergebnisse zeigen, daß residente und stimulierte Makrophagen nahezu identische Phagozytose-Eigenschaften besitzen, daß aber die Phagozytose-Potenz durch Zusatz von Serum erheblich gesteigert werden kann. Da nach C.parvum-Stimulation jedoch deutlich mehr Zellen aus den Mäusen isoliert werden können (Tab. 5.6), wurden für das Standard-Versuchsdesign eine 5tägige Stimulation mit C.parvum und ein 10 %iger Serumzusatz festgelegt.

Tab. 5.6: Effekt der Dauer der *C.-parvum*-Stimulation auf die Anzahl der Makrophagen in der Maus

Tage nach <i>C.-parvum</i> -Stimulation	Anzahl Makrophagen/Maus
-	$24 \times 10^5$
4	$54 \times 10^5$
7	$85 \times 10^5$

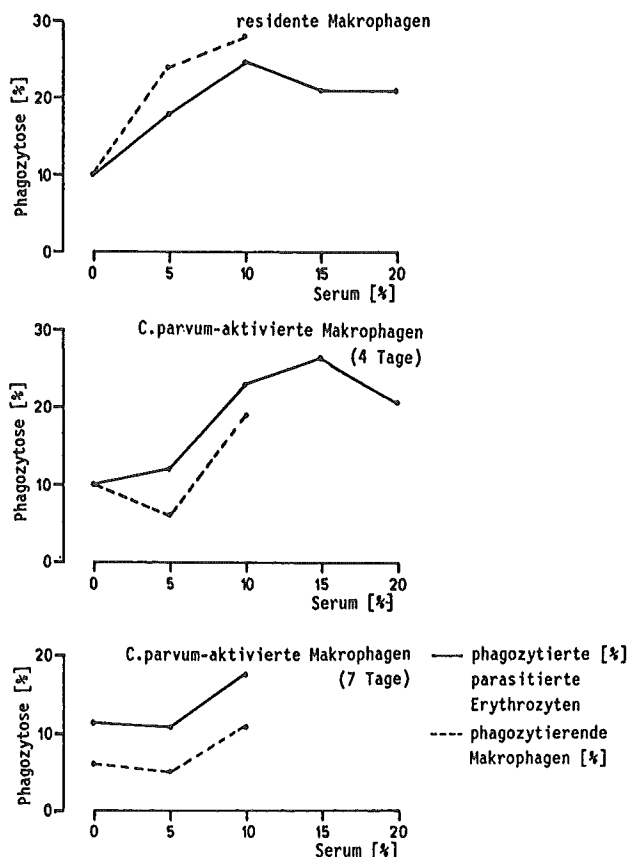


Abb. 5.7: Phagozytose parasitierter Erythrozyten durch Makrophagen an verschiedenen Tagen nach *C.-parvum*-Aktivierung und bei verschiedenen Konzentrationen von Mauserythrozyten-Antiserum, bestimmt durch Szintillationszählung (—) bzw. Lichtmikroskopie (---).



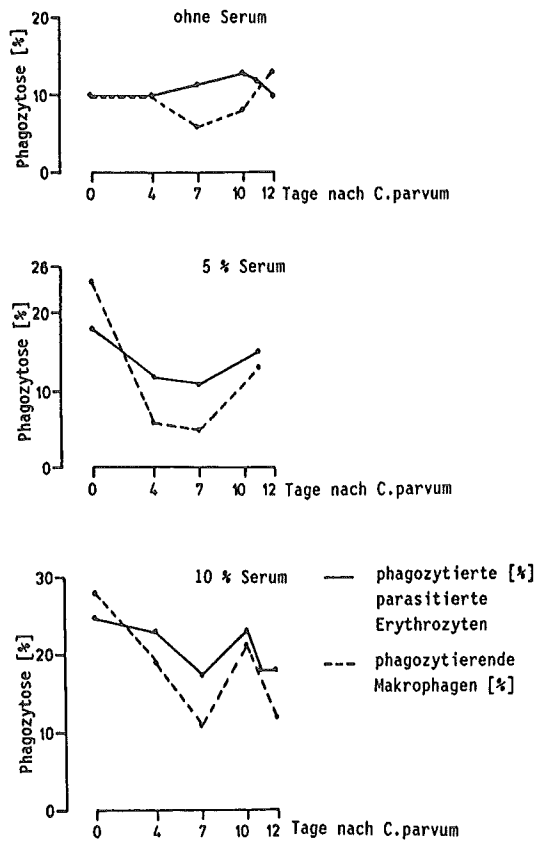


Abb. 5.8: Phagozytose parasitierter Erythrozyten durch Makrophagen an verschiedenen Tagen nach C.-parvum-Aktivierung und bei verschiedenen Konzentrationen an Mauserythrozyten-Antiserum, bestimmt durch Szintillationszählung (—) bzw. Lichtmikroskopie (---).

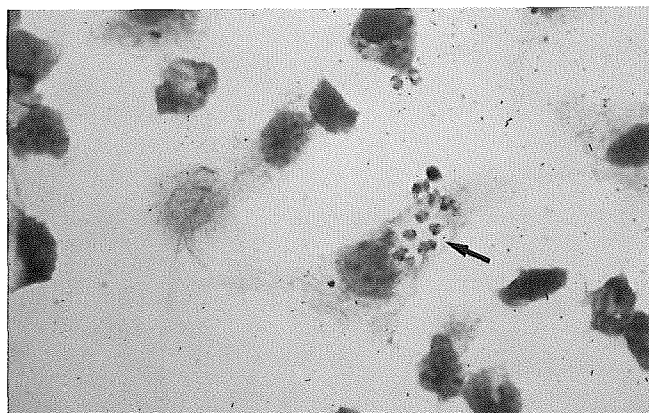
Aus den beiden genannten Abbildungen wird ebenfalls deutlich, daß die mikroskopisch bestimmte Anzahl der an der Phagozytose beteiligten Makrophagen (Abb. 5.9) gut mit den durch Szintillationsmessung gewonnenen Ergebnissen korreliert, so daß im Routinescreening auf die lichtmikroskopische Autoradiographie verzichtet werden kann.

Die für die Lösung der Substanzen verwendeten Lösungsmittel DMSO, DMF, Aceton und Ethanol zeigten bei Endkonzentrationen von 0,1 % - 1 % nur minimale Effekte in Abwesenheit (Abb. 5.10) und in Anwesenheit von Serum (Tab. 5.7).

**Tab. 5.7: Phagozytose parasitierter Erythrozyten durch Makrophagen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Lösungsmitteln. Inkubation mit Mauserythrozyten-Antiserum.**

Lösungs- mittel	Vol. %	phagozytierte Zellen	% vs. Kontrolle
DMSO	1	$2,12 \times 10^5$	35,8
	5	$2,16 \times 10^5$	36,0
	10	$1,89 \times 10^5$	31,5
DMF	1	$2,17 \times 10^5$	36,2
	5	$2,23 \times 10^5$	37,2
	10	$1,87 \times 10^5$	31,2
Ethanol	10	$2,02 \times 10^5$	33,7
Kontrolle		$1,93 \times 10^5$	32,2

A



B

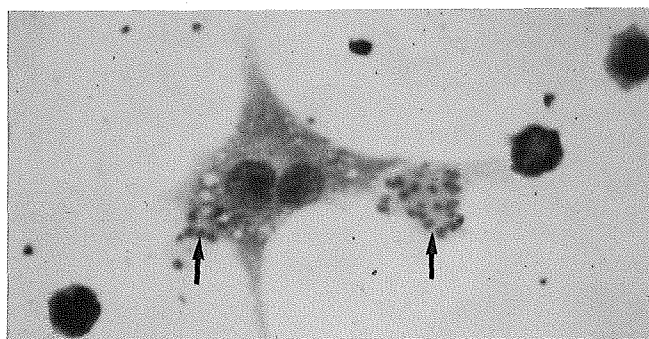


Abb. 5.9: Lichtmikroskopische Autoradiographie: Peritonealmakrophagen der Maus (A) und die Makrophagen-ähnliche Zelllinie P388D<sub>1</sub> (B) bei der Phagozytierung von parasitierten Erythrozyten (Pfeil) - Giemsaefärbung, 927fache Vergrößerung.

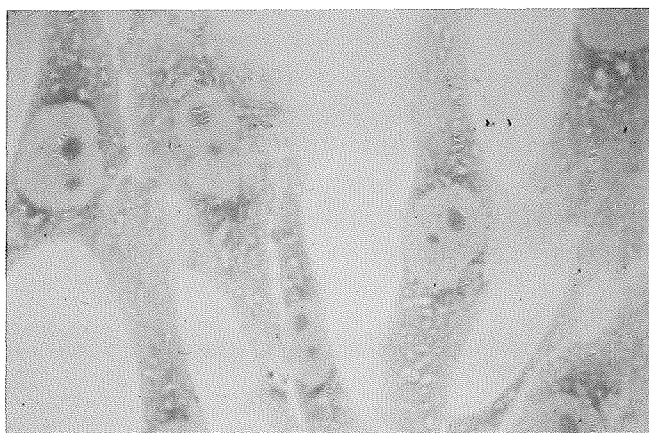


Abb. 5.12: Nierenzellenprimärkultur aus afrikanischen Meerkatzen, Giemsaefärbung, 927fache Vergrößerung.

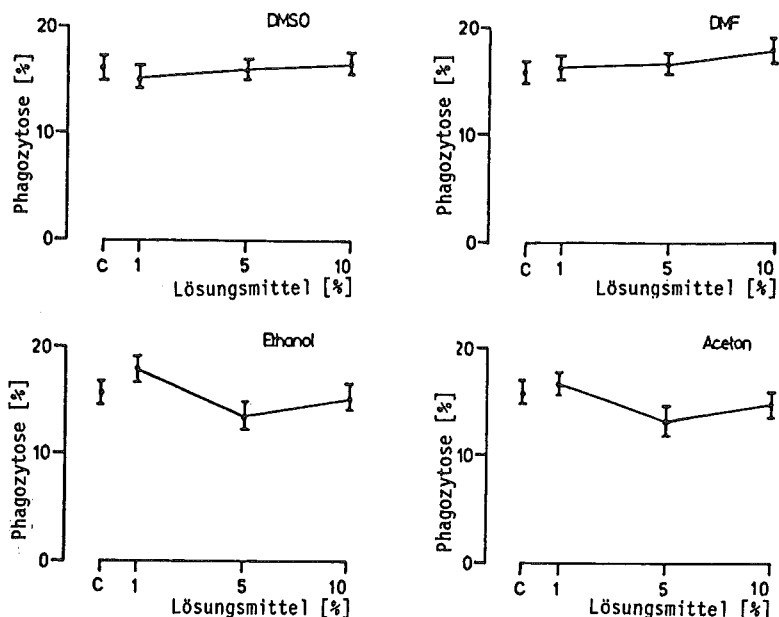


Abb. 5.10: Phagozytose von parasitierten Erythrozyten in Gegenwart verschiedener Lösungsmittelkonzentrationen. Inkubation ohne Mauserythrozyten-Antiserum; C = Kontrolle.

Zur Standardisierung und zur Ermittlung der maximalen Phagozytoseraten in diesem Test wurden verschiedene Referenzsubstanzen überprüft (Tab. 5.8): Die Ergebnisse waren zum Teil überraschend. So würde man von den überprüften Antimalariamitteln Chloroquin, Chinin, Chinacrin und Pyrimethamin eine gesteigerte Phagozytoserate erwarten, da teilweise zerstörte oder abgetötete parasitierte Erythrozyten eher als fremd erkannt und somit auch stärker phagozytiert werden. Dieser Effekt trat jedoch nur bei zwei (Chinacrin, Pyrimethamin) der 4 getesteten Substanzen auf, während Chinin und Chloroquin eine deutliche Hemmung anzeigten. Das Ergebnis könnte damit erklärt werden, daß Chloroquin und Chinin neben ihrer Wirkung auf die parasitierten Erythrozyten einen starken Effekt auf die Makrophagen aufweisen.

Die Hemmung der Phagozytose durch diese beiden Substanzen ist jedoch aus der Literatur bekannt (Ward, 1969; Prasad et al., 1984).

Die Immunmodulatoren Bestatin, Isoprinosin und Levamisol zeigten teilweise etwas schwankende Ergebnisse, die nicht mit der erwarteten Steigerung der Phagozytosekapazität in Ein-

klang zu bringen und wahrscheinlich Ausdruck der Heterogenität der Makrophagenpopulation sind. Daher sind mehrfache Wiederholungen der einzelnen Tests zur Absicherung auf jeden Fall erforderlich, wie sie bisher infolge des erheblichen Zeitaufwandes noch nicht durchgeführt werden konnten. Eventuell hätten auch verlängerte Präinkubationszeiten bessere Ergebnisse gebracht.

Viele der weiterhin überprüften Substanzen - wie z.B. Dexamethason und andere Kortikosteroide - zeigen selten In-vitro-Wirkung, sind jedoch in In-vivo-Entzündungsmodellen stark wirksam. Die hier in vitro gefundene leichte Hemmung der Phagozytose durch Dexamethason entspricht jedoch einem Befund von Becker & Grasso (1985) bei der Phagozytose von Hefen.

Herauszustellen ist weiterhin, daß der Metabolit des Zytostatikums Cyclophosphamid, Hydroxyperoxycyclophosphamid in vitro sehr gute Wirksamkeit aufweist, ebenso auch die beiden Antibiotika Amphotericin B und Doxycyclin. Ein hemmender Effekt Doxycyclins auf die Phagozytose von humanen Granulozyten ist auch von anderen Autoren beschrieben worden (Hahn et al., 1985).

*Tab. 5.8: Einfluß von Referenzsubstanzen auf die Phagozytose von parasitierten Erythrozyten durch Peritoneal-Makrophagen der Maus nach 2-20stündiger Vorinkubation. Angegeben ist die prozentuale Veränderung gegenüber der Kontrolle.*

Substanz	Veränderung gegenüber Kontrolle		
	10 <sup>-6</sup> [mol/l]	$\frac{[\%]}{10^{-5}}$ [mol/l]	10 <sup>-4</sup> [mol/l]
N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin-6-O-stearoyl	-14,40	-11,50	-59,20
N-Acetylmuramyl-D-alanyl-D-isoglutamin	- 3,90	- 6,20	- 6,20
N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin	+ 4,90	+11,90	+21,80
Amphotericin B	-22,90	-31,60	-41,65
Bestatin	+20,00	-10,00	+10,70
4-Bromophenacylbromid	+11,50	- 9,70	- 4,20
Katalase	-41,10	-42,00	-51,40
Chloroquin	-45,85	-42,80	-28,45
Chlorpromazin	+ 2,60	+ 4,30	-45,90
Cyclosporin A	-32,10	-14,50	-25,60
Dexamethason	+11,20	-26,10	-25,25
Delimmun <sup>R</sup>			
Isoprinosin, Methisoprinol	+ 9,30	-16,40	-16,40
Doxycyclin	(0,1 mg/ml)		-52,25
Levamisol	- 2,90	-12,10	-18,60
NDGA	-20,40	-23,20	-34,10
D-Penicillamin	-26,15	-28,80	-26,25
Propranolol	+ 7,70	-17,50	-28,00
Pyrimethamin	-12,95	+ 1,40	+15,90
Quercetin	-44,60	-44,85	-25,65
Quinacrin	+28,20	+31,60	+44,40
Quinin	-22,40	-23,60	-19,60

Um auch die Tiere einsparen zu können, die für die Gewinnung der Makrophagen notwendig sind, wurde versucht, für diesen Test die Maus-Makrophagen-Zelllinie P388D<sub>1</sub> einzusetzen: Es konnten hier sowohl bei der Bestimmung der phagozytierten Radioaktivität (Tab. 5.9) als auch mit lichtmikroskopischer Autoradiographie (Abb. 5.9) akzeptable Phagozytoseraten nachgewiesen werden, die mit denen der Peritoneal-Makrophagen weitgehend korrelierten (Abb. 5.9).

Tab. 5.9: Phagozytose parasitierter Erythrozyten durch die Makrophagen-ähnliche Zelllinie P388D<sub>1</sub>

	phagozytierte Zellen	% Phagozytose
Kontrolle		
Ohne Serum	1,18 x 10 <sup>5</sup>	19,7
Kontrolle		
mit Serum	1,19 x 10 <sup>5</sup>	19,8
10 % DMSO		
ohne Serum	1,03 x 10 <sup>5</sup>	17,2
10 % DMSO		
mit Serum	1,11 x 10 <sup>5</sup>	18,5

Ein erstes Substanzscreening mit Hilfe von Peritoneal-Makrophagen und P388D<sub>1</sub>-Zellen lieferte weitgehend Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen (Tab. 5.10) und läßt einen Verzicht auf die als Makrophagen-Spender eingesetzten Mäuse somit möglich erscheinen, so daß der Tierverbrauch reduziert werden kann.

Tab. 5.10: Vergleich der Phagozytierung parasitierter Erythrozyten durch Peritonealmakrophagen bzw. P388D<sub>1</sub>-Zellen nach 2stündiger Vorinkubation. Angegeben ist die prozentuale Veränderung gegenüber der Kontrolle, n = 1.

Substanzen	Veränd. vs. Kontrolle[%] Peritonealmakrophagen			Veränd. vs. Kontr. [%] P388D <sub>1</sub> -Zellen		
	10 <sup>-6</sup> [mol/l]	10 <sup>-5</sup> [mol/l]	10 <sup>-4</sup> [mol/l]	10 <sup>-6</sup> [mol/l]	10 <sup>-5</sup> [mol/l]	10 <sup>-4</sup> [mol/l]
NAT 04-159	- 9,2	- 8,0	-17,7	-18,9	-25,2	-22,6
NAT 04-455	-15,4	-13,3	-36,4	-18,9	-18,2	-28,9
NAT 06-051	- 7,6	-31,0	-46,0	-16,4	-14,9	-56,3
NAT 06-136	+ 4,0	+ 8,7	- 3,2	-12,7	-18,7	-34,0
Bestatin	-19,5	- 0,4	+ 7,4		-27,7	-32,4
Doxycyclin	+32,1	- 2,0	+ 9,0	-22,0	- 8,2	-26,4

Obwohl durch parasitierte Erythrozyten keine Makrophagen-Chemilumineszenz erzeugt werden kann, konnten doch teilweise übereinstimmende und sich somit ergänzende Ergebnisse zwi-

schen dem Phagozytostest und der Zymosan-induzierten Chemilumineszenz erreicht werden (Tab. 5.11).

*Tab. 5.11: Vergleich zwischen der Phagozytose parasitierter Erythrozyten durch Peritonealmakrophagen und der Chemilumineszenz (CL) nach Stimulierung. Die Chemilumineszenz C.-parvum-aktivierter Maus-Peritoneal-Makrophagen nach Stimulation mit opsonisiertem Zymosan wurde als relative Lichteinheiten bestimmt. Weitere Details zur Meßmethode sind in Kapitel 2.6 beschrieben. Angegeben ist die prozentuale Veränderung im Vergleich zur Kontrolle, n = 1-3.*

Substanz	Veränd. vs. Kontr. [%]			Veränd. vs. Kontr. [%]		
	Phagozytose			Chemilumineszenz		
	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>
	[mol/l]			[mol/l]		
NAT 06-051	- 7,6	-31,0	-46,0	-26,0	-10,0	-48,0
NAT 01-499	- 6,1	+ 3,8	+21,3	-17,0	-28,0	-71,0
NAT 04-159	-16,4	-16,8	-27,3	-10,0	-31,0	-91,0
NAT 06-606	+22,4	- 1,6	+10,4	-13,0	-35,0	-80,0
Levamisol	- 2,9	-12,1	-18,6	-10,0		+ 7,0
NDGA	-20,4	-23,2	-34,1	-17,0	-64,0	-97,0

#### 5.4.3.2 In-vitro-/Ex-vivo-Korrelation

Zum Nachweis der In-vivo-Wirksamkeit von Prüfsubstanzen, die in vitro deutliche Effekte zeigten und zur Herstellung einer Korrelation wurde ein Ex-vivo-Modell herangezogen: Dabei wurde Mäusen 2-7 Tage vor Gewinnung der C.-parvum-stimulierten Peritoneal-Makrophagen die jeweilige Testsubstanz einmalig oder mehrmalig intraperitoneal oder per os appliziert und die Phagozytose-Aktivität der Makrophagen geprüft. Tabelle 5.12 faßt die ex vivo erzielten Ergebnisse zusammen. Zieht man zur Korrelation der in vitro mit den ex vivo erzielten Ergebnissen die Tabelle 5.8 heran, so findet man eine gute Übereinstimmung zwischen den ex vivo mit Cyclophosphamid und in vitro mit dem wirksamen Metaboliten Hydroxyperoxycyclophosphamid erzielten Ergebnissen, die jedoch aus unerklärlichen Gründen nicht mit der aus der Literatur bekannten Stimulation der Antikörper-abhängigen Phagozytose korrelieren (Giordano et al., 1985). Auch bei N-Acetylmuramyl-L-Alanyl-D-Isoglutamin-6-0-Stearoyl liegen übereinstimmende Ergebnisse vor, während D-Penicillamin und Levamisol in vitro schwache bis mitt-



lere Hemmaktivität zeigten, während sie ex vivo keinen Effekt auf die Peritoneal-Makrophagen zu haben scheinen. Die Wirkungsrichtung von Dexamethason scheint von der gewählten Dosierung bzw. Konzentration abzuhängen.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, daß ein Screening von Immunmodulatoren mit einem In-vitro-Prüfsystem sinnvoll ist, daß jedoch noch weitere Erfahrungen gewonnen werden müssen. Daneben sollte zur Herstellung der In-vivo-/In-vitro-Korrelation ein In-vivo-Modell wie z.B. die "Candida-albicans-Infektion" herangezogen werden.

*Tab. 5.12: Phagozytose von parasitierten Erythrozyten durch Maus-Peritonealmakrophagen nach Verabreichung von Prüfsubstanzen (Ex-vivo-Experiment). Angegeben ist die prozentuale Veränderung gegenüber der Kontrolle, n = 1-2.*

Substanz	Vorbehandlungs- periode [Tage]	Dosis [mg/kg] (Appl.)	%
N-Acetylmuramyl-L- alanyl-D-isoglutamin- 6-O-stearoyl	2	5,0 (i.p.)	-13,4
N-Acetylmuramyl-D- alanyl-D-isoglutamin	2	5,0 (i.p.)	+ 0,9
N-Acetylmuramyl-L- alanyl-D-isoglutamin	2	5,0 (i.p.)	- 7,0
Cyclophosphamid	2	200,0 (i.p.)	-18,0
Dexamethason	4/3/2/1	2,0 (p.o.)	+14,82
Levamisol	4/3/2/1	15,0 (p.o.)	+ 5,7
D-Penicillamin	4/3/2/1	75,0 (p.o.)	+ 8,7
NAT 06-051	2	100,0 (p.o.)	-17,4
NAT 04-159	7 bis 2	10,0 (p.o.)	+ 0,57
NAT 04-159	7 bis 2	31,6 (p.o.)	+11,9

## **5.5 Wachstumskurve von *Trypanosoma brucei brucei***

### **5.5.1 Prinzip des Testverfahrens und Aussagemöglichkeit**

In Gegenwart einer "Mammalian Feeder Layer", für die Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze (Fibroblasten-ähnliche Zelllinie) herangezogen werden, entwickeln sich in Zellkultur zwischen den Fibroblasten trypomastigote Trypanosomen, deren Wachstum sich täglich mikroskopisch bestimmen läßt. In Gegenwart von potentiell trypanoziden Substanzen ist die Wachstumsrate verringert.

Dieses Prüfmodell eignet sich als Screening-Test für die Suche nach Verbindungen, die als Pharmaka für die Bekämpfung der Nagana (Rinderseuche), aber auch der Schlafkrankheit herangezogen werden können. Da Trypanosomen unter konventionellen Kulturbedingungen nur die Formen ausbilden, in denen sie normalerweise in ihrem Vektor, der Tsetsefliege, auftreten, müssen für diesen Test Kulturbedingungen herangezogen werden, die auch trypomastigote Stadien entstehen lassen, d.h. die Formen, die im Blut des Wirtstieres für die Entstehung der Krankheit verantwortlich sind. Die Kultivierung solcher trypomastigoter Formen ist in Gegenwart einer "Mammalian Feeder Layer" möglich (vgl. Hirumi et al., 1980, Brun et al., 1981, Borowy 1982).

### **5.5.2 Material und Methoden**

#### **5.5.2.1 Parasit**

Der verwendete *Trypanosoma-brucei-brucei*-Stamm (8/18) wurde 1985 vom BGA (Dr. Reinhard/Dr. Staak) übernommen. Er ist stark virulent für Mäuse, d.h. die Infektion verläuft innerhalb von 3-5 Tagen letal.

#### **5.5.2.2 Kultur- und Versuchsmedien**

Kulturmedium: RPMI-1640-Medium (Fa. Flow) unter Zusatz von:

- 20 mmol Glutamin (Fa. Nunc)
- 10 % foetales Kälberserum (FKS) (Fa. Flow)
- 100 IU/ml Penicillin (Fa. Flow)
- 100 µg/ml Streptomycin (Fa. Flow)

Versuchsmedium: RPMI-1640-Medium (Fa. Flow) unter Zusatz von:  
- 20 % FKS (Fa. Flow)

#### *5.5.2.3 Versuchstiere und -haltung*

Als Versuchstiere dienten männliche NMRI-Mäuse (Lippische Versuchstierzucht, Extertal) mit einem Körpergewicht von 18-20 g.

Die Haltung erfolgt in Makrolon-Käfigen Nr. 2 unter Fütterung von Altromin-Standard-Diät und Wasser ad libitum.

#### *5.5.2.4 Passage des Parasiten*

Die Stammhaltung der Trypanosomen erfolgt durch intraperitoneales Überimpfen von 200-300 Trypanosomen von Maus zu Maus alle 3-4 Tage.

#### *5.5.2.5 Kultivierung der Fibroblasten*

Die "African Green Monkey Kidney Primary Cells" (Fa. Flow) werden in 40 ml-Zellkulturflaschen (Fa. Nunc) in dem unter 5.5.2.2. angegebenen Kulturmedium gehalten. Die Passage erfolgt nach Überwachsen der Kulturflaschen durch Trypsinsieren.

#### *5.5.2.6 Versuchsdurchführung*

$1 \times 10^4$  Fibroblasten/Vertiefung läßt man in "Multiwell-dishes" (Fa. Nunc) 3 Tage anwachsen und versetzt sie mit  $1,1 \times 10^5$  isolierten Trypanosomen in 0,9 ml Versuchsmedium unter Zusatz von 0,1 ml Substanz- bzw. Kontrollösung. Die Anzahl der Trypanosomen wird täglich mikroskopisch bestimmt (Zählkammer) und die Hälfte des Mediums erneuert.

### *5.5.3 Ergebnisse*

#### *5.5.3.1 Entwicklung des Modells*

Die verwendeten "African Green Monkey Kidney Primary Cells" zeigen in Kultur von 3. Tag an ein nahezu kontinuierliches Wachstum (Abb. 5.11). Die Fibroblasten-ähnliche Struktur

dieser Zellen wird in Abb. 5.12 (S. 533) deutlich. In Anwesenheit der "Mammalian Feeder Layer" findet man bis zum 3. Tag eine relativ konstante Anzahl von Trypanosomen/ml, während am 4. Tag nahezu kein Wachstum mehr zu messen ist (Abb. 5.13).

Die als Referenzsubstanzen eingesetzten Verbindungen Trypamidum und Berenil, aber auch die beiden Prüfsubstanzen NAT 06-051 und NAT 06-491 zeigten deutliche Effekte in diesem Testmodell (Abb. 5.14).

#### *5.5.3.2 In-vivo-/In-vitro-Korrelation*

Für die In-vivo-/In-vitro-Korrelation wurde ein Maus-Modell herangezogen, das beim Bundesgesundheitsamt in Berlin bereits etabliert ist, so daß die tierexperimentell aufwendigen Vorversuche nicht notwendig waren. In diesem Modell werden NMRI-Mäuse intraperitoneal mit dem gleichen Trypanosoma-brucei-brucei-Stamm (8/18) infiziert; die Substanzapplikation erfolgt 2 Stunden p.i. als Einzeldosis. Als Kriterien für die Wirksamkeit einer Substanz werden die Überlebenszeit p.i. sowie die Parasitämie herangezogen.

Die in vivo erhobenen Daten (Tab. 5.13) zeigen die gute Wirksamkeit der beiden oben erwähnten Referenzsubstanzen in vivo und deuten damit auf eine gute In-vivo-/In-vitro-Korrelation hin. Dagegen hatte NAT 06-051 in vivo keine Wirkung. Da mittlerweile bekannt ist, daß NAT 06-051 einem ausgeprägten "First-Pass-Effekt" unterliegt und im Plasma zum großen Teil an Albumin gebunden ist, ist anzunehmen, daß die fehlende In-vivo-Wirksamkeit auf die besonderen pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanz zurückzuführen ist.

*Tab. 5.13: In-vivo-Effekte verschiedener Wirkstoffe auf die T.-b.-brucei-Infektion in Mäusen (n = 4 pro Gruppe)*

Substanz	Dosis [mg/kg]	Effekt
Berenil <sup>R</sup>	6	alle Tiere parasitenfrei
	3	14 Tage p.i.
	2	
	1	
	0,5	alle Tiere mit parasitenfreien Perioden - dreifache Überlebens- zeit im Vergleich zur Kontrolle
Trypamidium <sup>R</sup>	2	alle Tiere parasitenfrei
	1	14 Tage p.i.
	0,5	
	0,25	
	0,125	
NAT 06-051	400	kein Effekt
	100	kein Effekt
	25	kein Effekt

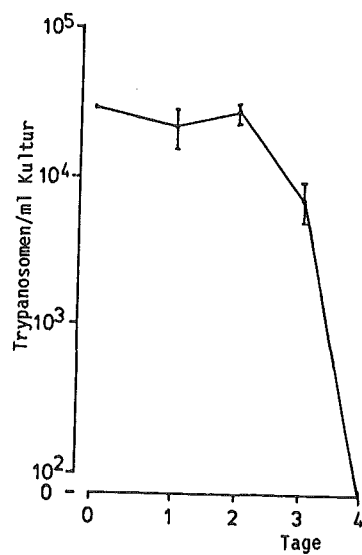


Abb. 5.11: Wachstumskurve einer Nierenzellenprimärkultur aus afrikanischen Meerkatzen,  $n = 4$ , Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung vom Mittelwert.

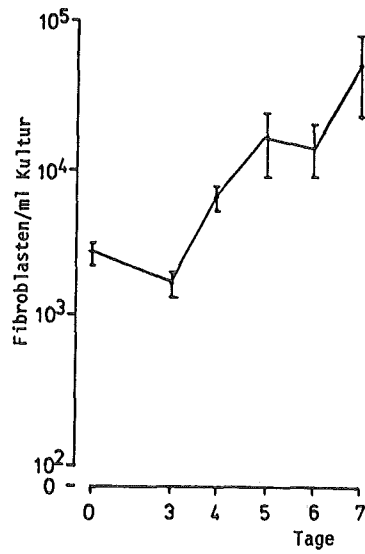


Abb. 5.13: Wachstumskurve von Trypomastigoten von *T.b.brucei* in Gegenwart einer "mammalian feeder layer",  $n = 8$ , Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung vom Mittelwert.

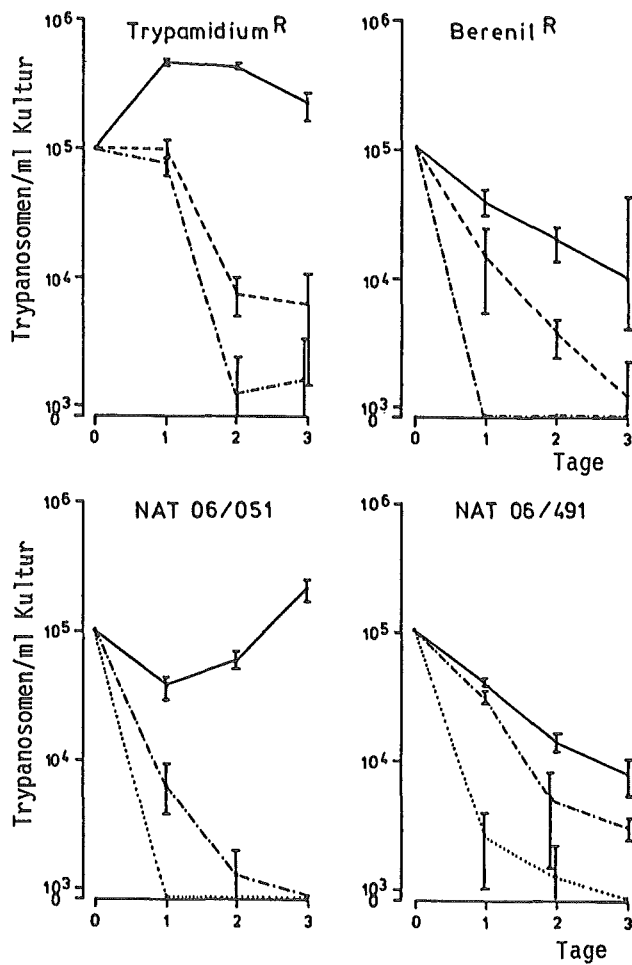


Abb. 5.14: Einfluß von Prüfsubstanzen auf das Wachstumsverhalten von Trypomastigoten von *T.b.brucei* in Gegenwart einer "mammalian feeder layer",  $n = 4$ . Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

(—) Kontrolle;  
 (---)  $10^{-6}$  mol/l;  
 (-.-.-)  $10^{-5}$  mol/l;  
 (.....)  $10^{-4}$  mol/l.



## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, C.W.M. and O.B. Bayliss (1976)  
Detection of macrophages in atherosclerotic lesions with  
cytochrome oxidase  
Brit. J. Exp. Pathol. 57, 30 - 36
- Alcocer-Varela, J., A. Laffon and J. Alacón-Segovia (1984)  
Differences in the production of and/or the response to  
interleukin-2 by T-lymphocytes from patients with the  
various connective tissue diseases  
Rheumatol. Int. 4, 39-44
- Agel, N.M., R.Y. Ball, H. Waldmann and M.J. Mitchinson (1984)  
Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic  
plaques  
Atherosclerosis 53, 265 - 271
- Agel, N.M., R.Y. Ball, H. Waldmann and M.J. Mitchinson (1985)  
Identification of macrophages and smooth muscle cells in  
human atherosclerosis using monoclonal antibodies  
J. Pathol. 146, 197 - 204
- Arens, H., B. Ulbrich, H. Fischer, M.J. Parnham and A. Römer  
(1986)  
Novel Antiinflammatory Flavonoids from Podophyllum versi-  
pelle Cell Culture  
Planta Med. 6, 468-473
- Arntzenius, A.C., D. Kromhout, J.D. Barth, J.H. Reiber,  
A.V. Bruschke, B. Buis, G.M. van Gent, N. Kempen-Voogd,  
S. Strikwerdaand E.A. van der Velde (1985)  
Diet, Lipoproteins, and the Progression of Coronary  
Atherosclerosis. The Leiden Intervention Trial  
New Engl. J. Med. 312, 805 - 811
- Arunlakshana, O. and H.O. Schild (1959)  
Some quantitative uses of drug antagonists  
Br. J. Pharmacol. Chemother. 14, 48-58

- Assmann, G. (1982)  
 Cytogenesis of atherosclerotic lesions  
 In: Lipid metabolism and atherosclerosis. Stuttgart,  
 Schattauer, 55 - 66
- Assmann, G. (1985)  
 Oral presentation at the "Fourth Münster International  
 Arteriosclerosis Symposium", 30.09. - 02.10.1985
- Assmann, G., H. Schriewer and H. Schulte (1985)  
 HDL Cholesterol, Apolipoprotein A-I and Coronary Risk  
 Factors: Intermediate Results of a Prospective Cardio-  
 vascular Study in Westphalia  
 J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 567 - 568
- Assmann, G., H. Schulte and U. Wahrburg (1988)  
 Konzepte zur Atherosklerose-Prävention  
 Münch. Med. Wschr. 130, 260 - 267
- Aviram, M., E.L. Bierman and J.F. Oram (1989)  
 High density lipoprotein stimulates sterol translocation  
 between intracellular and plasma membrane pools in human  
 monocyte-derived macrophages  
 J. Lipid Research 30, 65-76
- Baggioni, M. and J. Schnyder (1979)  
 Macrophage activation and the mechanism of tissue  
 distruction  
 In: "Connective Tissue Changes in Rheumatoid Arthritis  
 and the use of penicillamine"  
 Ed.: Bonta, I.L. and A. Cats  
 Agents and Action Suppl. 5, Birkhäuser Verlag,  
 Basel 25-38
- Becker, J. and R.J. Grasso (1985)  
 Suppression of Phagocytosis by Dexamethasone in Macro-  
 phage Cultures: Inability of Arachidonic Acid, Indometha-  
 cin, and Norhydroguaiaretic Acid to Reserve the Inhibi-  
 tory Response Mediated by a Steroid-Inducible Factor  
 Int. J. Immunopharmac. 7, 839-847

- Bitter-Suermann, D., U. Hadding, F. Melchert and  
H.J. Wellensiek (1970)  
Independent and consecutive action of the complement components C5, C6 and C7 in immune hemolysis  
Immunochimistry 7, 955-965
- Blake, D.R., R.E. Allen and J. Lunec (1987)  
Free Radicals in Biological Systems - A Review Orientated to Inflammatory Processes  
Br. Med. Bull. 43, 371-385
- Borbe, H.O. and O. Zierenberg (1985)  
Amitriptylinoxide: Receptor-binding profile compared with other antidepressant drugs  
Pharmacopsychiat. 18, 314-319
- Borowy, N.K. (1982)  
Studies on the Activity of the Trypanocidal Diamidine Dapi in Comparison with Five Standard Trypanocides on T.b. Brucei in Culture, with Special Emphasis on the Development of In-vitro-Techniques for Drug Screening.  
Promotionsschrift, vorgelegt: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- Boyum, A. (1976)  
Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages  
Scand. J. Immunopharmac. 5 (5), 9-15
- Bradford, M.M. (1976)  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding  
Anal. Biochem. 72, 248-254
- Braquet, P. (Ed.) (1988)  
Platelet-Activating Factor and Cell Immunology  
New Trends in Lipid Mediators Research Vol. 1, Karger, Basel
- Braquet, P., L. Touqui, T.Y. Shen and B.B. Vargaftiq (1987)  
Perspectives in Platelet-Activating Research  
Pharmacol. Rev. 39, 97-145

- Brown, J.H. and S.H. Pollock (1970)  
 Inhibition of Elastase and Collagenase by antiinflammatory drugs  
 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135, 792-795
- Brown, M.S., P.T. Kouanen und J.L Goldstein (1981)  
 Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors  
 Science 212, 628-635
- Brun, K., L. Jenni, M. Schönenberger and K.-F. Schell (1981)  
 In vitro Cultivation of Bloodstream Forms of Trypanosoma  
 brucei, T. rhodesiense, and T. gambiense  
 Protozol. 28, 470-479
- Campbell, G.R. (1986)  
 Phenotypic changes in smooth muscle cells of human  
 atherosclerotic plaques  
 In: The evolution of the human atherosclerotic plaque.  
 Proceedings of the American Heart Association workshop on  
 the evolution of the human atherosclerotic plaque,  
 Washington DC, Sept. 20 - 23. Berlin, Springer-Verlag (in  
 press)
- Cawston, T.E. and A.J. Barrett (1979)  
 A rapid and reproducible assay for collagenase using  
 [1-<sup>14</sup>C]-acetylated collagen  
 Anal. Biochem. 99 (2), 340-345
- Cawston, T.E. and G. Murphy (1981)  
 Mammalian Collagenases  
 In: "Meth. in Enzymology", Vol. 80, Part C, Ed. L.  
 Lorand, pp. 711-722
- Clark, J.A., N.H. Hunt and W.B. Cowden (1986)  
 Oxygen-derived Free Radicals in the Pathogenesis of Para-  
 sitic Diseases  
 Adv. Parasitol. 25, 1-44
- Cunningham and Szenberg (1968)  
 Further improvements in the plaque technique for detect-  
 ing single antibody-forming cells  
 Immunology 14, 599-601

- De Angelis, L. (1979)  
Animal techniques for evaluating benzodiazepine drugs  
Meth. and Find. Exptl. Clin. Pharmacol. 1, 129-155
- Dinareello, C.A. (1988)  
Biology of Interleukin-1  
FASEB J. 2, 108-115
- Dupont, B., J.A. Hansen, and E.J. Yunis (1976)  
Human mixed-lymphocyte culture reaction: genetics, specificity, and biological implications  
In: G. Kunkel and F.J. Dixon: Advances in Immunology, Vol. 23,  
Academic Press, 1976, New York-San Francisco-London
- Eastoe, J.E. (1967)  
in "Treatise on Collagen" (Ramachandran, G.N. ed.)  
Vol. 1, Academic Press N.Y. pp. 1-72
- Eling, W. (1977a)  
Ficoll fractionation for the separation of parasitized erythrocytes from malaria infected blood  
Bull. WHO 55, 105-114
- Eling, W. (1977b)  
Separation of parasitized erythrocytes from Plasmodium berghei infected mouse blood  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 71, 267-268
- Endo, A., M. Kuroda, and K. Tanzawa (1976)  
Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity  
FEBS Letters 72, 323-326
- Engelbrecht, S., E. Pieper, H.W. Macartney, W. Rautenberg, H.R. Wenzel and H. Tschesche (1982)  
Separation of the human leucocyte enzymes alanine aminopeptidase, cathepsin G, collagenase, elastase and myeloperoxidase  
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie 363 (3), 305-315

- Erickson, S.K., M.A. Shrewbury, C. Brooks and D.J. Meyer  
(1980)  
Rat liver acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase:  
its regulation in vivo and some of its properties  
in vitro  
J. Lipid Res. 21, 930-941
- Etherington, D.J., J.A. Silver and R. Gibbons (1979)  
An in vitro model for the study of collagen degradation  
during acute inflammation  
Life Sci. 25, 1885-1892
- Fassbender, H.G. (1975)  
Pathologie rheumatischer Erkrankungen  
Springer Verlag
- Feuerstein, G. and J.M. Hallenbeck (1987)  
Leukotrienes in Health and Disease  
FASEB J. 1, 186-192
- Fink, R. and H. Dancygier (1987)  
Interleukin-2  
Dtsch. Med. Wschr. 112, 188-193
- Ford-Hutchinson, A.W., M.A. Bray and M.J. Smith (1980)  
The aggregation of rat neutrophils by arachidonic acid: a  
possible bioassay for lipooxygenase activity  
J. Pharm. Pharmac. 12, 868-869
- Frick, M.H., O. Elo, K. Haapa, O.P. Heinonen, P. Heinsalmi,  
P. Helo, J.K. Huttenen, P. Kaitaniemi, P. Koskinen,  
V. Manninen, H. Maenpaa, M. Malkonen, M. Manttara,  
S. Norola, A. Pasternack, J. Pikkariainen, M. Romo,  
T. Sjoblom and E.A. Nikkilä (1987)  
Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with  
gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia  
N. Engl. J. Med. 317, 1237 - 1245
- Gillard, J.W. and Y. Guinden (1987)  
The Leukotrienes: Prospects for Therapy Against a Unique  
Family of Pathophysiological Mediators  
Drugs of the Future 12, 453-474

- Giordano, M., M.S. Palermo and M.A. Isturiz (1985)  
Enhancement of Phagocytosis by Different Antineoplastic  
Drugs  
Int. J. Immunopharmac. 7, 19-23
- Gisslow, M.I. and B.C. McBride (1975)  
A rapid sensitive collagenase assay  
Anal. Biochem. 68 (1), 70-78
- Goetzl, E.J. and F.F. Sun (1979)  
Generation of unique mono-hydroxy eicosatetraenoic acids  
from arachidonic acid by human neutrophils  
J. Exp. Med. 150, 406-411
- Gordon, T., W.P. Castelli, M.C. Hjortland, W.B. Kannel (1980)  
The prediction of coronary heart disease by high density  
and other lipoproteins: An historical perspective  
In: Rifkind, B.M., Levy, R.I. (eds.) Hyperlipidemia, Dia-  
gnosis and Therapy. Grune & Stratton, New York, San Fran-  
cisco, London, 71 ff.
- Gough, N.M. (1988)  
Rapid and quantitative precipitation of cytoplasmic RNA  
from small numbers of cells  
Anal. Biochem. 173, 93-95
- Gown, A.M., T. Tsukada and R. Ross (1986)  
Human atherosclerosis II. Immunocytochemical analysis of  
the cellular composition of human atherosclerotic lesions  
Am. J. Pathol. 125, 191 - 207
- Grandel, K.E. (1987)  
Platelet Activating Factor  
Drugs of Today 23, 257-268
- Grimes, A., H.J. McArdle and J.F.B. Mercer (1988)  
A total extract dot blot hybridization procedure for mRNA  
quantitation in small samples of tissues or cultured  
cells  
Anal. Biochem. 172, 436-443

Gryglewski, R.J. (1977)

Some experimental models for the study of inflammation and anti-inflammatory drugs

In: Inflammation: Mechanisms and their impact on therapy

Ed.: Bonta, I.L., J. Thompson and K. Brune

Agents and Actions Suppl. 3, Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 17-23

Haberland, M.E., D. Fong and L. Cheng (1988)

Malondialdehyde-altered protein occurs in Atheroma of

Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits

Science 241, 215-219

Hahn, H. von, D. Kuhring, M. Trautmann and T. Diamantstein (1985)

Einfluß von Cefalor, Doxycyclin und weiteren oralen Antibiotika auf die Phagozytose polymorphkerniger Granulozyten und PHA-induzierte Stimulation von Blutlymphozyten des Menschen

Arzneim.-Forsch./Drug Res. 35, 543-546

Hall, L.S. and D.S. Gordon (1976)

Reproducibility, efficiency and methodology of mitogen induced lymphocyte transformations by the whole blood assay

J. Immunol. Methods 12, 31-38

Halliwel, B. J.R. Houlst and D.R. Blake (1988)

Oxidants, Inflammation, and Anti-inflammatory Drugs

FASEB J. 2, 2867-2873

Halpaap, H. (1978)

DC-Fertigplatten mit Konzentrierungszone: Bestimmung von Lipiden im Serum

Merck Kontakte 1, 32-34

Harris, E.D.Jr. and C.A. Vater (1980)

Methodology of collagenase research; substrate preparation, enzyme activation and purification

In: "Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues", Eds. Wooley, D.E., J.M. Evanson, Ch. Wiley, pp. 37-63



- Havekes, L., V. van Hinsbergh, H.J. Kempen and J. Emeis  
(1983)  
The metabolism *in vitro* of human low density lipoprotein  
by the human hepatoma cell line HepG2  
Biochem. J. 214, 951-958
- Henriksen, T., E.M. Mahoney and D. Steinberg (1981)  
Enhanced macrophage degradation of low density  
lipoprotein previously incubated with cultured  
endothelial cells: Recognition by receptors for  
acetylated low density lipoproteins  
Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 6499-6503
- Henson, P.M. (1977)  
Immune complex diseases: cellular mediator and the patho-  
genesis of inflammatory tissue injury produced by immune  
complexes  
BAYER-Symposium VI, Springer Verlag, Berlin-New York,  
pp. 94-106
- Higgs, G.A. and R.J. Flower (1981)  
Anti-inflammatory drugs and the inhibition of arachido-  
nate lipooxygenase  
Piper, P.J. (Ed.) SRS-A and Leukotrienes  
John Wiley & Sons, Ltd.
- Higgs, G.A., R.J. Flower and J.R. Vane (1979)  
A new approach to anti-inflammatory drugs  
Biochem. Pharmacol. 28, 1959-1961
- Hirumi, H., K. Hirumi, R.T. Nelson and J.J. Bwayo (1970)  
Present Status of *in vitro* Cultivation of Animal-Infec-  
tive African Trypanosomes  
In: The *in vitro* Cultivation of the Pathogens of Tropical  
Diseases  
Proceedings of the Workshop, Nairobi, Kenya, 4-9 February  
1979, Tropical Diseases Research Sev. No 3, Schwabe & Co.  
AG, Basel, 472 pp.

- Jamal, Z., R.A. Suffolk, G.S. Boyd and K.E. Suckling (1985)  
Metabolism of cholesteryl ester in monolayers of bovine  
adrenal cortical cells. Effects of an inhibitor of acyl-  
CoA:cholesterol acyltransferase  
Biochim. Biophys. Acta 834 (2), 230-237
- Jonasson, L., J. Holm, O. Skalli, G. Bondjers and  
G.K. Hansson (1986)  
Regional accumulation of T cells, macrophages and smooth  
muscle cells in the human atherosclerotic plaque  
Arteriosclerosis 6, 131 - 138
- Jondal, M. (1976)  
In: In vitro Methods in Cell mediated and tumor immunity  
Ed.: B.R. Bloom, J.R. David  
Academic Press, 263-266
- Kannel, W.B., W.P. Castelli and T. Gordon (1979)  
Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease.  
New perspectives based on Framingham study  
Ann. Intern. Med. 90, 85
- Keller, St. and I. Mandl (1971)  
Solubilized elastin as a substrate for elastase and  
elastase inhibitor determinations  
Biochem. Medicine 5, 342-347
- Kelly, W.N., E.D. Harris, S. Ruddy, L.B. Sledge (1981)  
in "Textbook of Rheumatology", W.B. Sanders,  
Philadelphia, pp. 3-52
- Kleesiek, K., E. van der Leur, R. Reinhardt and H. Greiling  
(1987)  
Pathobiochemical Significance of Granulocyte Elastase  
Complexed with Proteinase Inhibitors: Effect of Glycos-  
aminoglycan Metabolism in Cultured Synovial Cells  
J. Clin. Chem. Biochem. 25, 151-160
- Klurfeld, D.M. (1985)  
Identification of foam cells in human atherosclerotic  
lesions as macrophages using monoclonal antibodies  
Arch. Pathol. Lab. Med. 109, 445 - 449

- Knowles, B.B., C.C. Howe and D.P. Aden (1980)  
Human hepatomacellular carcinoma cell line secrete the  
major plasma proteins and hepatitis B surface antigen  
Science 209, 497-499
- Koo, C., T.L. Innerarity and R.W. Mahley (1985)  
Obligatory role of cholesterol and apolipoprotein E in  
the formation of large cholesterol-enriched and receptor-  
active high density lipoproteins  
J. Biol. Chem. 260, 11934-11943
- Kostner, G.M., E. Molinari and P. Pichler (1985)  
Evaluation of a new HDL<sub>2</sub>/HDL<sub>3</sub> quantitation method based  
on precipitation with polyethylene glycol  
Clin. Chim. Acta 148, 139-147
- Kottke, B.A. (1986)  
Lipid Markers for Atherosclerosis  
Am. J. Cardiol. 57, 11C - 17C
- Kottke, B.A., A.R. Zinsmeister, D.R. Holmes, D.M. Dink and  
S.J.T. Mao (1983)  
Assessment of apoprotein A-I as a marker of angiographi-  
cally assessed coronary arteries disease  
Arteriosclerosis 3, 481a (abstr.)
- Kovanen, P.T., M.S. Brown, S.K. Basu, D.W. Bilheimer and  
J.L. Goldstein (1981)  
Saturation and suppression of hepatic lipoprotein recep-  
tors. A mechanism for the hypercholesterolemia of chole-  
sterol-fed rabbits  
Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 1396-1400
- Körner, I.J., R. Dettmer, J. Kopp, M. Gaestel and W. Malz  
(1986)  
Simple preparation two-step purification of interleukin-2  
from culture medium of lectin stimulated normal human  
lymphocytes  
J. Immunol. Methods 87, 185-191

- Kuhl, P., S. Leyck, H. Lautenschläger and H.O. Borbe (1986a)  
 NAT 04-159: a selective inhibitor of  $LTB_4$ -formation  
 without effects on 5-lipoxygenase of human and porcine  
 leukocytes  
 In: Abstract book of the 6<sup>th</sup> international conference on  
 prostaglandins and related compounds, Florence (Italy)  
 June 3 - 6, 1986, p. 387
- Kuhl, P., H.O. Borbe, H. Fischer, A. Römer, A. and H. Safayi  
 (1986b)  
 Ebselen reduces the formation of  $LTB_4$  in human and por-  
 cine leukocytes by isomerisation to its 5S,12R-6-trans-  
 isomer  
 Prostaglandins 31, 1029 - 1048
- Kuhl, P., H.O. Borbe and R. Niemann (1986c)  
 Polyenephosphatidylcholine (PPC), a potent stimulator of  
 in vitro and ex vivo  $PGI_2$ -formation  
 Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 332, R34
- Laemmli, U.K. (1970)  
 Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of  
 the Head of Bacteriophage T4  
 Nature 227, 680-685
- Landolfo, S., M.G. Martinotti and P. Martinetto (1981)  
 Macrophage natural cytotoxicity against *Trichomonas vagi-*  
*nalis*.  
 In: Manual of macrophages, immun. series, Vol. 13; (Eds.)  
 Herscovitz, H.B., H.T. Holden, J.A. Bellanti, A. Ghaffar,  
 Marcel Dekker, New York-Basel, 297-301
- Lin, C.W., M.L. Orcutt and W.H. Fishman (1975)  
 Purification and characterization of mouse kidney  $\beta$ -glu-  
 curonidase  
 J. Biol. Chem. 250, 4737-4743
- Lipid Research Clinics Program (1984)  
 The lipid research clinics coronary primary prevention  
 trial  
 I. Reduction in incidence of coronary heart disease  
 JAMA (J. Am. Med. Assoc.) 251, 31-364

- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall  
(1951)  
Protein measurement with the folin phenol reagent  
J. Biol. Chem. 193, 265-275
- Lugtenberg, B., J. Meijers, R. Peters, P. van der Hoek and  
L. van Alphen (1975)  
Electrophoretic resolution of the "major outer membrane  
protein" of Escherichia coli K12 into four bands  
FEBS Lettr. 58 (1), 255-258
- Ma, P.T.S., G. Gil, T.C. Südhof, D.W. Bilheimer,  
J.L. Goldstein and M.S. Brown (1986)  
Mevinolin, an inhibitor of cholesterol synthesis, induces  
mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of  
hamsters and rabbits  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8370-8374
- Mac Lennon, J.C.M., A.C. Comphehl and D.G.L. Gale (1976)  
In: In vitro Methods in cell-mediated and tumor immunity  
Ed.: B.R. Bloom, J.R. David  
Academic Press, 511-522
- Macartney, H.W and H. Tschesche (1983)  
Latent and active human polymorph nuclear leukocyte col-  
lagenase. Isolation, purification and characterisation  
Eur. J. Biochem. 130 (1), 71-78
- MacCartley, D.J. (1979)  
Arthritis and Allied Conditions, 9th Ed.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrock (1982)  
Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring  
Harbour
- Martin, M. and K. Resch (1988)  
Interleukin-1: More Than a Mediator Between Leukocytes  
Trends Pharmacol. Sci. 9, 171-173
- Mashwell, M.A. (1982)  
A new solid-state reagent to iodination proteins.  
I. Conditions for the efficient labelling of antiserum  
Anal. Biochem. 125, 427-432

- Masui, Y., T. Taketo, S. Sakakibara, H. Hori and Y. Nagai  
(1977)  
Synthetic substrates for vertebrate collagenase  
Biochem. Med. 17 (2), 215-221
- Menninger, H. and W. Mohr (1981)  
Neutrophile Granulozyten und ihre Enzyme bei der entzündlichen rheumatischen Knorpeldestruktion  
Therapiewoche 31, 2134-2138 und 2141-2148
- Mishell, B.B. and S.M. Shiigi, (1980)  
Selected Methods in Cellular Immunology  
Freeman & Co., San Francisco, pp. 156-161
- Mishell, R.J. and R.W. Dutton (1967)  
Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice  
J. Exp. Med. 126, 423 ff.
- Miyazawa, T. (1989)  
Determination of phospholipid hydroperoxides in human blood plasma by a chemiluminescence-HPLC assay  
Free Radical Biology & Medicine 7, 209-217
- Morton, R.E., G.A. West and H.F. Hoff (1986)  
A low density lipoprotein-sized particle isolated from human atherosclerotic lesions is internalized by macrophages via a non-scavenger-receptor mechanism  
J. Lipid Res. 27, 1124-1134
- Murphy, G., U. Bretz, M. Bagglioni and J.J. Reynolds (1980)  
The latent collagenase and gelatinase of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes  
Biochem. J. 192 (2), 517-525
- Myers, R.F. and M.I. Siegl (1984)  
The appearance of phospholipase activity in the human macrophage-like cell line U937 during dimethyl sulfoxide induced differentiation  
Biochem. Biophys. Res. Com. 118, 217-224

- Nakajima K., J.C. Powers, B.M. Ashe und M. Zimmerman (1979)  
Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leucocyte elastase. Studies with peptide substrates related to the  $\alpha_1$ -protease inhibitor reactive site  
J. Biol. Chem. 254, 4027-4032
- Nakamura, A.E. and R.H. Abeles (1985)  
Mode of interaction of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl coenzyme A reductase with strong binding inhibitors: compactin and related compounds  
Biochemistry 24, 1364-1376
- Nikkilä, F.A., P. Viikinkowski, M. Valle and M.H. Frick, (1984)  
Prevention of progression of coronary atherosclerosis by treatment of hyperlipidaemia: A seven year prospective angiographic study  
Brit. Med. J. 289, 220 - 223
- Oehler, J.R. R.B. Herbemann and H.T. Holden (1978)  
Modulation of immunity by macrophages  
Pharmac. Ther. 2, 551-593
- Ohlsson, K. (1971)  
Properties of leucocytic protease  
Clin. Chim. Acta 32 (3), 399-405
- Okimura, T., H. Ohmori, Y. Kubota and I. Yamamoto (1979)  
Effects of anti-inflammatory and immuno-modulating agents on the release of  $\beta$ -glucuronidase from cultured macrophages of guinea pigs  
Biochem. Pharmacol. 28, 2729-2732
- Oronsky, A.L. and C.W. Buermann (1979)  
Neutral proteinases in rheumatoid arthritis  
Am. Rep. in Med. Chem. 14, 219-228
- Osoba, D. and J. Falic (1974)  
The mixed leukocyte reaction in man: Effect of pools of stimulating cells selected on the basis of cross-reacting HL-A specificities  
Cell. Immunol. 10, 117-136

- Palinski, W., M.E. Rosenfeld, S. Ylä-Herttula, G.C. Gurtner,  
St.S. Socher, S.W. Butler, S. Parathasarathy,  
Th. E. Carew and D. Steinberg (1989)  
Low density lipoprotein undergoes oxidative modification  
*in vivo*  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1372-1376
- Panayi, G.S., P. Wooley and I.R. Batchelor (1978)  
Genetic basis of rheumatoid disease: HLA antigens,  
disease manifestations, and toxic reaction to drugs  
Brit. Med. J. 2, 1326-1328
- Parnham, M.J. (1986)  
Eicosanoide und Entzündung: Mechanismen und Perspektiven  
für die Therapie  
Deutsche Apotheker Z. 126, 211-219
- Parnham, M.J. and E. Graf (1987)  
Seleno-organic Compounds and the Therapy of Hydroper-  
oxide-linked Pathological Conditions  
Biochem. Pharmacol. 36, 3095-3102
- Parnham, M.J. and W. Englberger (1988)  
Lipid Mediators and Lymphocyte Function  
In: "The Pharmacology of Lymphocytes"  
Ed.: Bray, M.A. and J. Morley  
Springer-Verlag, Berlin 385-414
- Pauly, J.L. (1976)  
A simple screening assay for substances affecting lym-  
phocyte reactivity  
J. Immunol. Methods 12, 141-147
- PHARMACIA, Produktinformationen "Affinity Chromatography",  
Principles and Methods
- Pick, E. and Y. Keisari (1980)  
A simple colorimetric method for the measurement of  
hydrogen peroxide produced by cells in culture  
J. Immunol. Methods 38, 161-170



- Plow, E.F. (1982)  
Leukocyte elastase release during blood coagulation. A potential mechanism for activation of the alternative fibrinolytic pathway  
J. Clin. Invest. 69, 564-572
- Prasad, R.N., N.K. Ganguly, R.C. Mahajan and S.K. Garg (1984)  
Effect of quinine on phagocytic functions of normal rhesus monkey (*Macaca mulatta*) monocytes  
Indian J. Med. Res. 79, 550-553
- Pujol, J.-P. and G. Loyau (1987)  
Interleukin-1 and Osteoarthritis  
Life Sci. 41, 1187-1198
- Rapp, H.J. and T. Borsos (1970)  
Molecular Basis of Complement Action, Appleton Century Crofts, New York
- Report of the Working group of Arteriosclerosis of the National Heart, Lung and Blood Institute (1981)  
Vol. 2. Washington, D.C.: Government Printing Office  
(DHEW publication no. (NIH) 82-2035)
- Rinderknecht, H., M.C. Geokas, P. Silverman and B.J. Haverbeck (1968)  
A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity  
Clin. Chim. Acta 21, 197-203
- Ringrose, P.S., M.A. Parr and M. McLaren (1975)  
Effects of anti-inflammatory and other compounds on the release of lysosomal enzymes from macrophages  
Biochem. Pharmacol. 24, 607-614
- Rogers, A.W. (1979)  
Practical autoradiography  
Review 20, 1-74, The Radiochemical Centre, Amersham, England
- Ross, A.C., K.J. Go, J.G. Heider and G.H. Rothblat (1984)  
Selective inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase by compound 58-035  
J. Biol. Chem. 259 (2), 815-819

- Schaefer, H.-E. (1981)  
The role of macrophages in atherosclerosis  
In: Schmalzl, F., Huhn, D., Schaefer, H.-E. (eds.) Disorders of the monocyte-macrophage system. Berlin, Springer-Verlag, 137 - 142
- Schenk, P.B., L.K. Johnson, K. Schwartz, H. Sista, R.M. Scarborough and J.A. Lewicki (1985)  
Distinct atrial natriuretic factor receptor sites on altered bovine aortic smooth muscle and endothelial cells  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 109, 943-949
- Schmitz, G., H. Robenek, H. Lohmann and G. Assmann (1985a)  
Interaction of high density lipoproteins with macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages  
EMBO J. 4, 613 - 622
- Schmitz, G., M. Beuck and H. Robenek (1988)  
Regulation of Cholesterol Efflux from Macrophages  
Agents and Actions Suppl. 26, 147-157
- Schmitz, G., R. Niemann, B. Brennhausen, R. Krause and G. Assmann (1985b)  
Regulation of high density lipoprotein receptors in cultured macrophages: role of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase  
EMBO J. 4, 2773 - 2779
- Schwabe, C. (1973)  
A fluorescent assay for proteolytic enzymes  
Anal. Biochem. 53, 484-490
- Scott, W.A., N.A. Pawlowski, H.W. Murray, M. Andreach, J. Zricke and Z.A. Cohn (1982)  
Regulation of arachidonic acid metabolism by macrophage activation  
J. Exp. Med. 155, 1148-1160

Stary, H.C. (1983)

Macrophages in coronary artery and aortic intima and in atherosclerotic lesions in children and young adults up to age 29

In: Schettler, F.G., Gotto, A.M., Middelhoff, G., Habenicht, A.J.R., Jurutka, K.R. (eds.) Atherosclerosis VI. Proceedings of the sixth international symposium. Berlin, Springer-Verlag, 462 - 466

Steinbrecher, U.P., S. Parthasarathy, D.S. Leake, J.L. Witzum and D. Steinberg (1984)

Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involved lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids

Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 3883-3887

Steiner, A.L., C.W. Parker and D.M. Knippis (1972)

Radioimmunoassay for cyclic nucleotides

J. Biol. Chem. 247 (4), 1106-1113

Steven, F.S., A. Torre-Blanco and J.A. Hunter (1975)

A neutral protease in rheumatoid synovial fluid capable of attacking the telopeptide regions of polymeric collagen fibrils

Biochim. Biophys. Acta 405 (1), 188-200

Stewart, C.C., S.F. Cramer and P.G. Steward (1975)

The response of human peripheral blood lymphocytes to Phythemagglutinin: Determination of cell numbers

Cell. Immunol. 16, 237-250

Tada, H., O. Shiho, K. Kuroshima, M. Koyama and K. Tsukamoto (1986)

An improved colorimetric assay for interleukin-2

J. Immunol. Methods 93 (2), 157-165

Taylor, J.C. and I.P. Crawford (1975)

Purification and preliminary characterization of human leucocyte elastase

Arch. Biochem. Biophys. 169, 91-101

- Terato, K., Y. Nagai, K. Kawanishi and S. Yamamoto (1976)  
A rapid assay method of collagenase activity using  $^{14}\text{C}$ -  
labeled soluble collagen as substrate  
Biochim. Biophys. Acta 445 (3), 753-762
- Teshima, T., J.C. Griffin and J.C. Powers (1982)  
A new class of heterocyclic serine protease inhibitors.  
Inhibition of human leukocyte elastase, porcine pancrea-  
tic elastase, cathepsin G, and bovine chymotrypsin A with  
substituted benzoxazinones, quinazolines, and  
anthranilates
- Timmermans, P.B.M.W.M. and P.A. van Zwieten (1980)  
Clonidine and some bridge analogues; cardiovascular  
effects and nuclear magnetic resonance data  
(sup 1H/sup 1sup 3C)  
Eur. J. Med. Chem. 15, 323-329
- Turner, S.R., J.A. Tainer and W.S. Lynn (1975)  
Biogenesis of chemotactic molecules by the arachidonate  
lipoxygenase system of platelets  
Nature 257, 680-681
- Udenfriend, S., S. Stein, P. Boehlen, W. Dairman, W. Leim-  
gruber, M. Weigle (1972)  
Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, pepti-  
des, proteins, and primary amines in the picomole range  
Science 178 (63), 871-872
- Vedeler, C.A., H. Nyland and R. Matre (1984)  
*In situ* characterization of the foam cells in early human  
atherosclerotic plaques  
Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. C 92, 133 - 137
- Waldman, S.A., R.M. Rapoport and F. Murad (1984)  
Atrial natriuretic factor selectively activates  
particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in  
rat tissue  
J. Biol. Chem. 259, 14332-14334
- Ward, P.A. (1969)  
Inhibition of phagocytosis by chloroquine  
J. Exp. Med. 124, 209

- Weber, K. and M. Osborn (1969)  
The reliability of molecular weight determination by  
dodecyl sulfat-polyacrylamide gel electrophoresis  
J. Biochem. 244, 4406-4412
- Weisgraber, K.H. and R.W. Mahley (1980)  
Subfractionation of human high density lipoproteins by  
heparin-Sepharose affinity chromatography  
J. Lipid Res. 21, 316-325
- Weishaar, R.E., St.D. Burrows, D.C. Kobylarz, M.M. Quade and  
D.B. Evans (1986)  
Multiple molecular forms of cyclic nucleotide phosphodi-  
esterase in cardiac and smooth muscle and in platelets.  
Isolation, characterization, and effects of various refe-  
rence phosphodiesterase inhibitors and cardiotonic agents  
Biochem. Pharmacol. 35 (5), 787-800
- Wilkinson, M. (1988)  
A rapid and convenient method for isolation of nuclear,  
cytoplasmic and total cellular RNA  
Nucl. Acids Res. 16, 10934
- Williams, M.A. (1977)  
Autoradiography and Immunochemistry: Preparation of Elec-  
tron Microscope Autoradiographs  
In: Practical Methods in Electron Microscopy, (Ed.) A.M.  
Glauert, North Holland Publ. Company, Amsterdam-New York-  
Oxford, Vol. 6, Teil 1, Kap. 4, 77-163
- Wilson, P.W., R.J. Garrison, W.P. Castelli, N. Feinleib,  
P.M. McNamara and W.B. Kannel (1980)  
Prevalence of coronary heart disease in the Framingham  
offspring study: Role of Lipoprotein Cholesterols  
Am. J. Cardiol. 46, 649
- Yaari, S., H. Goldhourn, S. Evan-Zohar and H.N. Neufeld  
(1981)  
Association of serum high density lipoprotein and total  
cholesterol with total, cardiovascular, and cancer morta-  
lity in a 7-year prospective study of 10,000 men  
Lancet 1, 1011

Yoshimura, T., L.N. Barker and J.C. Powers (1982)

Specificity and reactivity of human leukocyte elastase, porcine pancreatic elastase, human granulocyte cathepsin G, and bovine pancreatic chymotrypsin with arylsulfonyl fluorides. Discovery of a new series of potent and specific irreversible elastase inhibitors

J. Biol. Chem. 257, 5077-5084

Zawadzki, Z., R.W. Milne and Y.L. Marcel (1989)

An immunochemical marker of low density lipoprotein oxidation

J. Lipid Res. 30, 885-891

Zebrower, M.E., F.J. Kieras and W.T. Brown (1986)

Analysis by High-Performance Liquid Chromatography of Hyaluronic Acid and Chondroitin Sulfates

Analytical Biochemistry 157, 93-99

- 1 Pharmakologische Untersuchungen in vitro –  
Alternativen zum Tierversuch  
E. Weber (Hrsg)









**ISBN 3-89336-042-5**